

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE EMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش-الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE
EL HARRACH (ALGER)

THESE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT ES SCIENCES
EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Présentée par : Hacene EL HAMEUR

Caractérisation phénotypique et biotechnologique d'écotypes
de *Lactococcus lactis* dans le bassin laitier du moyen Chélif

Devant le jury :

Président : **BENCHABANE** Ahmed

Professeur ENSA EL Harrach

Directeur de thèse : **DILMI BOURAS** Abdelkader

Professeur UHB Chleff

Co-directeur de thèse : **PHILLIPE JACQUES** Jean

Professeur polytech Lille- France

Examineur : **ALLEM** Rachida

Professeur UHB Chleff

Examineur : **SBAIHIA** Mohamed

Maitre de conférences A UHB Chleff

Examineur : **AMIALI** Malek

Maitre de conférences A ENSA EL Harrach

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1- LES BACTERIES LACTIQUES	1
2- BIODIVERSITE DE LA FLORE LACTIQUE CHEZ L' ANIMAL LAITIER	3
3- LES LACTOCOQUES : TAXONOMIE ET CARACTERISTIQUES	6
4- LACTOCOQUES TYPIQUES ET ATYPIQUES	7
5- POTENTIELS BIOTECHNOLOGIQUES	8
5.1- Ferments lactiques et utilisations en agro-alimentaire	9
5.2 - Fonctions des ferments lactiques	9
5.3 - Activité acidifiante	10
5.4 - Activité protéolytique	11
5.5 - Activité lipolytique et formation de substances aromatiques	12
5.6 - Formation des exopolysaccharides	13
6 - LES PROBIOTIQUES	13
6.1- Critères de sélection	14
7 - LES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES LACTIQUES	
7.1 - Substances antimicrobiennes à faible poids moléculaire	16
7.3 - Substances antimicrobiennes à haut poids moléculaire : Les bactériocines	17
7.5 Classification	18
7.6 Mode d'action	18
7.7 – Propriétés	20
8 - PRODUCTION BIOTECHNOLOGIQUE DE METABOLITES DE BACTERIES LACTIQUES	
8.1 - L'acide lactique	21
8.2 - Les technologies de fermentation par cellules immobilisées	22
8.3 - Effets physiologiques et morphologiques de l'immobilisation	26

Chapitre 2- MATERIELS ET METHODES

MATERIEL BIOLOGIQUES

1- Le LAIT	28
1.1- Origine du lait	28
1.2- Prélèvement et contrôle des laits	28
1.3-Technique de prélèvement du lait	28
1.4- Estimation de la charge microbienne des laits prélevés	28
2- SOUCHES DE LACTOCOQUES	28
2.1- Origine des souches	29
2.2- Choix des laits	29
2.3- Prélèvement et conditionnement	29
2.3- Isolement et purification des lactocoques	29
- Techniques d'isolement	29
- Techniques de purification	29
- Conservation des souches	29
3- IDENTIFICATION DES SOUCHES	30
3.1 - Etude des caractères cultureux et morphologique	30
3.2- Etude des caractères physiologiques et biochimiques	30
3.2.1- Caractères physiologiques	30
3.2.2- Caractères biochimiques	32
3.2.3- Caractérisation du métabolisme carboné	33
3.2.4- Etude du métabolisme azoté	33
4- CARACTERISATION TECHNOLOGIQUE DES SOUCHES	
4.1- Comportement vis avis de substances protéiques	33
4.2- Etude du pouvoir acidifiant	34
4.3- Etude de la croissance	34
4.4- Mesure du diacétyle	34
5- CLASSEMENT DES SOUCHES PAR OUTIL STATISTIQUE	
5.1- Principe de l'ACP	34
6- ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE	36

6.1- Tolérance à l'acidité gastrique	36
6.2- Tolérance aux sels biliaires	36
6.3- Assimilation du cholestérol	36
6.4- Assimilation du triglycéride total	36
6.5- Dégradation du lactose	37
6.6- Adhésion et colonisation	37
6.6.1- Hydrophobicité	38
6.6.2- Auto- agrégation	38
6.6.3- Coaggregation	38
6.7- Comportement vis avis d'antibiotiques	38
6.8- Activité anti radicalaire	38
6.9 Activité antimicrobienne	39
6.9.1- Sensibilité de la bactériocine aux pH, enzymes et températures	
6.9.2- Cinétique de croissance et de production de la bactériocine	40
6.9.3- Extraction, purification et identification de la bactériocine	41
7- TECHNIQUE D'IMMOBILISATION	42
8- CONDUITE DE LA FERMENTATION	42
9- MILIEUX DE CULTURE	43
9.1- Les milieux synthétiques	43
9.2- Les milieux naturels	43
10- METHODES D'ANALYSES	44
10.1- Analyses physico chimiques et biochimiques	44
10.2- Analyses physique	46
10.3- Analyses statistiques	47

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1-Aperçu sur le bassin laitier du moyen Cheliff	48
2-Caractéristiques des laits et élaboration du souchier	
3- Caractéristiques phénotypiques des isolats de lactococcus	52
4- Aptitudes technologiques des isolats	59

Croissance et pouvoir acidifiant	59
La production d'amines biogènes	69
Activité protéolytique	70
Production du diacétyle	72
5- Caractérisation <i>in vitro</i> du potentiel probiotique	73
Réduction du cholestérol	74
Dégradation des triglycérides	77
Dégradation du lactose	78
Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées	79
Croissance en présence de bile	80
Pouvoir d'adhésion	84
Agrégation et autoagrégation	86
Propriétés antioxydantes	88
6- Production biotechnologique de l'acide lactique	89
6.1- Caractérisation du support	89
6.2- Caractéristiques de la souche LcL9	90
6.3- Cinétique d'immobilisation de la biomasse	92
6.4- Production en mode continu de l'acide lactique	94
5	:
Activité antimicrobienne (anti listeria)	
7.1- Nature et propriétés physicochimiques de la bactériocine	100
7.2- Extraction et purification de la bactériocine	102
7.3- Caractérisation moléculaire de la bactériocine	104
- Production de la bactériocine anti-listeria	
8.1- Choix du milieu de culture	106
8.2- Cinétique de croissance en condition planctonique	106
8.3- Devenir du métabolisme glucidique	108
8.4- Production de la bactériocine en conditions planctonique	111
8.5- Production de la bactériocine par cellules immobilisées	112
Conclusion générale	116
Références bibliographiques	121

Liste des figures

- Figure 1 :** Mode de contamination du trayon de vache laitière (Gourreau, 1995).
- Figure 2 :** Anatomie du trayon et de la mamelle chez la vache laitière (Denis et Meyer, 1999).
- Figure 3 :** Distribution de la flore de surface du trayon de vaches laitières par méthode de culture dépendante A biologie moléculaire directe B.
- Figure 4 :** Mode d'action des bacteriocines des bactéries lactiques (Aymerich et *al.*, 2000 ; Martínez et *al.*, 2000 ; Breukink et *al.*, 2006 ; Alvarez et *al.*, 2011).
- Figure 5 :** Dispositif du bioréacteur de fermentation en continu.
- Figure 6 :** Localisation de la zone d'étude (source Atlas mondial, année 2005).
- Figure 7 :** Distribution annuelle moyenne en pourcent des sous espèces de *Lactococcus lactis* dans le lait de vache, de brebis et de chèvre dans le bassin laitier du moyen Chellif.
- Figure 8 :** Carte représentant les sites de prélèvements et de persistance de sous espèces de *Lactococcus lactis* selon l'appartenance animale.
- Figure 9 :** Prévalence de la sous espèces *Lactococcus lactis subsp lactis* en fonction des saisons et de l'origine animale dans le bassin laitier du moyen Chellif.
- Figure 10 :** Prévalence de la sous espèces *Lactococcus lactis subsp cremoris* en fonction des saisons et de l'origine animale dans le bassin laitier du moyen Chellif.
- Figure 11 :** Prévalence en fonction de l'origine animale dans le bassin laitier du moyen Chellif.
- Figure 12 :** Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine bovine *Lc.C1*, *Lc.D1*, *Lc.D4*, *Lc.L1*, *Lc.L2*, *Lc.L7*, *Lc.L10* et *Lc.L11*.
- Figure 13 :** Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine bovine *Lc.L51*, *Lc.L6*, *Lc.L8* (suite).
- Figure 14 :** Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine caprine *Lcl3*, *Lcl4*, *Lcl9*, *Lcl12*, *Lcl13*, *Lcc**.
- Figure 15 :** Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine ovine *Lcc2*, *Lcd3*, *Lcl14*.
- Figure 16 :** Cercle de variabilité en fonction des facteurs.
- Figure 17 :** Cercle de corrélation des variables entre les deux premiers axes.
- Figure 18 :** Projection des individus sur le plan formé par les variables (A) et des individus (B) sur les deux axes.
- Figure 19 :** Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine bovine.
- Figure 20 :** Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine bovine (suite).

- Figure 21** : Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine caprine.
- Figure 22** : Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine ovine.
- Figure 23** : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine bovine.
- Figure 24** : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine bovine (suite).
- Figure 25** : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine caprine.
- Figure 26** : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine ovine.
- Figure 27** : Production du Diacétyle par les souches de *Lactococcus lactis subsp Diacetylactis* sur lait de vache à 21°C.
- Figure 28** : Cholestérol assimilé par les isolats de lait de vaches.
- Figure 29** : Cholestérol assimilé par les isolats de lait de brebis.
- Figure 30** : Cholestérol assimilé par les isolats du lait de chèvres.
- Figure 31** : Dégradation des triglycérides par l'isolat de laits de vaches.
- Figure 32** : Dégradation des triglycérides par l'isolat de laits de chèvres.
- Figure 32** : Dégradation des triglycérides par les souches de laits de brebis.
- Figure 33** : Lactose dégradé en % par les isolats du lait de vaches.
- Figure 34** : Lactose dégradé en % par les isolats du lait caprin.
- Figure 35** : Lactose dégradé en pourcent par les souches du lait ovin.
- Figure 36** : Viabilité des isolats d'origine bovine à pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.
- Figure 37** : Viabilité des isolats d'origine caprine a pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.
- Figure 38** : Viabilité des isolats d'origine ovine a pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.
- Figure 39** : Viabilité des isolats d'origine ovine a pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.
- Figure 40** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 2,5 des souches d'origines caprines.
- Figure 41** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 2,5 des souches d'origines ovines.
- Figure 42** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 4,5 des souches d'origines bovine.
- Figure 43** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 4,5 des souches d'origines caprine.

- Figure 44** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 4,5 des souches d'origines ovine.
- Figure 45** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 6,5 des souches d'origines bovine.
- Figure 46** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 6,5 des souches d'origines caprine.
- Figure 47** : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 6,5 des souches d'origines ovine.
- Figure 48** : Hydrophobicité des souches originaire du lait de vache.
- Figure 49** : l'hydrophobicité des souches originaire du lait de chèvre.
- Figure 50** : Hydrophobicité des souches originaire du lait de brebis.
- Figure 51** : Pourcentage d'auto agrégation en condition aérobie.
- Figure 52** : Pourcentage d'auto agrégation en condition aérobie.
- Figure 53** : Coaggregation aérobie des souches testées.
- Figure 54** : Coaggregation en pourcent des souches en condition anaérobie.
- Figure 55** : Pourcentage de l'activité antioxydante des souches testées.
- Figure 56** : Aspect alvéolaire de la pouzzolane sous loupe binoculaire (Grossissement X10).
- Figure 57** : Imagerie électronique de surface de la pouzzolane de Beni saf.
- Figure 58** : Diffractogramme aux rayons X de la pouzzolane de Beni-saf (filtre Cu, $K\alpha$ radiation, Ni).
- Figure 59** : Evolution de la biomasse cellulaire en présence et en absence de pouzzolane à 3% (p/v) de la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 cultivée sur lactosérum enrichi à 30°C et a pH initial de 6,5.
- Figure 60** : Production d'acide lactique (g/l) par la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 en conditions planctoniques immobilisées sur pouzzolane aux granulométries de 1,25, 4 et 6,25 mm cultivées à 30°C dans le milieu lactosérum supplémenté (LS).
- Figure 61** : Lactose résiduel (g/l) de la fermentation par les cellules planctonique et les cellules immobilisées en culture batch de la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 sur pouzzolane à différentes granulométries cultivées à 30°C dans le milieu LS.
- Figure 62** : teneur en acide lactique (g/l) en fonction du taux de dilution et du temps à 30°C.
- Figure 63** : Lactose résiduel en fonction des taux de dilution et du temps de fermentation.
- Figure 64** : Evolution de la matière sèche (g/g de support) de la biomasse cellulaire en fonction des taux de dilution et du temps à 30°C.
- Figure 65** : Influence de la température et du pH sur l'activité de la bactériocine.
- Figure 66** : Influence de la concentration en sulfate d'ammonium sur l'extraction de la bactériocine.

- Figure 67** : Chromatogramme RP – HPLC du surnageant Elliker ;
- Figure 68** : Chromatogrammes : RP-HPLC précipitation au chloroforme et au sulfate d'ammonium.
- Figure 69** : chromatogramme RP – HPLC Adsorption – Désorption.
- Figure 70** : Spectrométrie de masse de la bactériocine purifiée par adsorption désorption.
- Figure 71** : Courbes de croissance de la souche *Lactococcus lactis subsp cremoris c'* dans les milieux ; Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes –lactosérum à 30°C.
- Figure 72** : Evolution de la viabilité cellulaire dans Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum à 30°C.
- Figure 73** : Evolution du pH durant la croissance dans Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum à 30°C.
- Figure 74** : Consommation des sucres et production de lactate dans le lactosérum par la souche *Lactococcus lactis subsp cremoris*.
- Figure 75** : Consommation des sucres et production de lactate dans le jus de dattes par la souche *Lactococcus lactis subsp cremoris*.
- Figure 76** : Consommation des sucres et production de lactate dans le milieu Elliker par la souche *Lactococcus lactis subsp cremoris*.
- Figure 77** : Consommation des sucres et production de lactate dans le mélange jus de dattes – lactosérum par la souche *Lactococcus lactis subsp cremoris C'*.
- Figure 78** : Diamètre d'inhibition de *listeria innocua* par la bactériocine produite dans le milieu en fonction du temps en culture planctonique.
- Figure 79** : Inhibition de *listeria innocua* par le surnageant de la souche dans le lactosérum.
- Figure 80** : Evolution de la concentration en bactériocine exprimée en UA ml⁻¹ pour les différents milieux de culture en culture planctonique.
- Figure 81** : les diamètres des zones d'inhibition des différents surnageants des cultures dans les trois milieux en batch à cellules libres.
- Figure 82** : Evolution du biofilm (biomasse fixée) en fonction du temps sur le support dans les quatre milieux.
- Figure 83** : Production de la bactériocine en UA ml⁻¹ en batch recyclé par la souche immobilisée sur pouzzolane (50% p/v).

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Utilisations des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemples des espèces impliquées prédominantes (d'après McKay et Baldwin, 1990).
- Tableau 2 :** Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (Dellaglio et *al.*, 1994).
- Tableau 3 :** Séquence et taille du génome d'espèce et sous espèces de bactéries lactiques (Leeuwenhoek, 2002)
- Tableau 4 :** Avantages et désavantages de la technologie des cellules immobilisées.
- Tableau 5 :** Lieu, origine animale et nombre de prélèvement du lait cru.
- Tableau 6 :** Caractéristiques physico chimiques des laits de prélèvements (Saison printanière valeurs moyennes de deux années successives 2005/2006).
- Tableau 7 :** Caractéristiques biochimiques des laits de prélèvements (Saison printanière valeurs moyennes de deux années successives 2005/2006).
- Tableau 8 :** Répartition saisonnière des souches de lactococcus selon l'origine animale.
- Tableau 9 :** Caractéristiques des souches de lactocoques originaires du lait de vaches.
- Tableau 10 :** Profile de fermentation des sucres des isolats du lait de vaches.
- Tableau 11 :** Caractéristiques des souches de lactocoques originaires du lait de chèvres.
- Tableau 12 :** Profile de fermentation des sucres des isolats du lait de chèvres.
- Tableau 13 :** Caractéristiques des souches de lactocoques originaires du lait de brebis.
- Tableau 14 :** Profil de fermentation des sucres des isolats du lait de brebis.
- Tableau 15 :** Taux de croissance μ et temps des souches appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* cultivées sur milieu M17.
- Tableau 16 :** Valeurs cardinales pour l'ensemble des isolats.
- Tableau 17 :** Corrélations entre les variables.
- Tableau 18 :** Corrélations des variables avec les axes principaux.
- Tableau 19 :** Détermination de la variation du pH avec et sans Histidine après 24 heures d'incubation.
- Tableau 20 :** Antibiogramme des souches de *L. lactis*.
- Tableau 21 :** Appréciation qualitative de l'activité protéolytique des cultures pures de *lactococcus lactis* à 30°C sur lait de Sherman après 24heures d'incubation.
- Tableau 22 :** Production du diacétyle par Lc.D₁, Lc.D₂, Lc.D₃ et Lc.D₄ sur lait de vache, de brebis et de chèvre.
- Tableau 23 :** Performance des souches dans l'élimination du cholestérol.
- Tableau 24 :** Composition chimique centésimale de la pouzzolane de Beni-saf.

- Tableau 25** : Propriétés Physiques et physico-chimiques de la pouzzolane de Beni-saf.
- Tableau 26** : Affinité de *Lactococcus lactis subsp lactis LcL9* pour les trois solvants utilisés dans la méthode MATS après culture sur Elliker et lactosérum enrichi à 30°C.
- Tableau 27** : Récapitulatif de la production d'acide lactique, du lactose résiduel de la conversion et de la productivité aux différents taux de dilution D.
- Tableau 28** : Influence du milieu de culture sur l'activité anti-listeria de *Lactococcus lactis subsp cremoris*.
- Tableau 29** : Sensibilité de la bactériocine aux enzymes.
- Tableau 30** : Effet des solvants sur l'activité de la bactériocine.
- Tableau 31** : Effet des agents tensioactifs.
- Tableau 32** : Effet des sels et Agents chélatants.
- Tableau 33** : Effet des solvants sur l'activité de la bactériocine (diamètre en mm).
- Tableau 34** : Composition des milieux (Elliker, lactosérum doux et jus de dattes) utilisés.
- Tableau 35** : Taux de croissance, temps de génération et variation du pH pour 24 heures de la souche cultivée sur Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum à 30°C.

Liste des Abréviations

BSH : Bile Salt Hydrolase.

DPPH : 2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl.

JDD : Jus de dattes.

Lc L D : *Lactococcus lactis subsp lactis biovar biacetylactis*

LcL : *Lactococcus lactis subsp lactis*.

Lc L. C : *Lactococcus lactis subsp cremoris*.

LS : Lactoserum supplémenté.

ROS : Reactive Oxygen Species

UA : Unité Arbitraire.

NBAL Gram+ : Non bactéries lactiques Gram+

BAL : Bactéries lactiques

Remerciements

Mes premiers grands remerciements vont tout d'abord à mon directeur et codirecteur de thèse, le professeur Dilmibouras AEK et le professeur Phillippe jacques, pour toute leur aide. Ils étaient toujours attentifs et disponibles malgré leurs nombreuses charges. Leur compétence, leur rigueur scientifique et leur clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Je suis ravi d'avoir travaillé en leur compagnie qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance.

A tous les membres de mon jury pour avoir consacré du temps et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, qu'il s'agit de :

Monsieur Benchabane Ahmed, professeur et enseignant à l'ENSA d'El-Harrach
Je vous remercie vivement pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse. Pour m'avoir soutenue durant mon cursus universitaire en tant qu'enseignant et personne de qualité, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

A Madame Allem Rachida professeur à l'université Hassiba Benbouali de Chlef pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

A monsieur Amiali Malek maitre de conférences à l'ENSA d'El-Harrach Je vous remercie d'avoir donné du temps pour évaluer ce travail.

Pour l'honneur que vous me faites d'être examinateur dans mon jury de thèse, monsieur Sbaihia Mohamed Maître de Conférences à l'université Hassiba Benbouali. D'une manière ou d'une autre vous avez joué un rôle certain dans l'accomplissement de cette œuvre je tiens particulièrement à vous souligner toute ma reconnaissance

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire Probiogem et en particulier un retentissant hommage à feu monsieur le professeur Guillochon. Madame le professeur Nedjar arroume Naima trouvez ici toute ma gratitude et mes profonds respects. Je ne saurai oublier Frédéric gancel et François krier maitres de conférences pour leur aide et leurs soutient durant mon séjour en France qu'ils trouvent ici mes sincères reconnaissances.

Je remercie ceux qui ont veillé sur moi depuis toujours, ceux qui m'ont fait confiance, qui m'ont soutenue sans faille dans tous mes projets et qui ont toujours accepté mes choix, merci à mes parents. Merci à mes amis pour leur présence et leur soutien et en particulier à monsieur Bougherra Fatah.

1- Les bactéries lactiques

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. La découverte de leur action sur le lait fut probablement accidentelle et leur première utilisation humaine a été mise en évidence dans des textes archaïques datant de plus de 5000 ans retrouvés en Iraq (Teuber, 1993). Leur utilisation fut perpétuée ensuite sous forme de levains naturels (Chammas et *al.*, 2006 ; Zamfir et *al.*, 2006). La première culture pure était de *Bacterium lactis* vraisemblablement des *Lactococcus lactis*, obtenue par Lister en 1873. Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits (Klein et *al.*, 1998 ; Guiraud, 2003 ; Limsowtin et *al.*, 2004). Leurs caractéristiques métaboliques en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires. Elles y sont classiquement impliquées, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (Tableau I). Le principal atout de ces bactéries réside dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires. L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes (Stiles, 1996). Il a également un rôle direct dans l'industrie laitière puisqu'il permet la formation du caillé à bas pH.

Les bactéries lactiques participent également à la texture (production d'exopolysaccharides) et à la saveur des produits laitiers. Les arômes sont multiples, parfois indésirables (amines biogènes) et peuvent provenir d'origines diverses, soit du catabolisme des hydrates de carbone présents dans le lait (lactose, citrate), soit du métabolisme des acides aminés ou encore des matières grasses. Elles ont été isolées de nombreux milieux naturels végétaux (plantes et fruits), animaux et humains (cavité buccale et vaginale, fèces, lait, ...). Certaines espèces semblent adaptées à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leur habitat naturel (De Roissart, 1986). Le groupe de bactéries lactiques a été défini pour la première fois par Orla-jensen (1919). Ce sont des micro-organismes à Gram positif, non sporulant, non mobiles, anaérobies mais aérotolérants et ne possédant aucune catalase.

Phylogénétiquement, les bactéries lactiques appartiennent à la branche clostridienne des bactéries à Gram positif. Possèdent moins de 55 % de bases GC dans leur génome. Ainsi, ces caractéristiques les éloignent des bifidobactéries longtemps considérées comme appartenant à ce groupe. La compréhension de la physiologie de ces microorganismes contribue ainsi à un meilleur contrôle des procédés de même qu'à l'amélioration et à la diversification des qualités organoleptiques et texturales des produits laitiers fermentés.

Tableau I : Utilisations des bactéries lactiques dans l'alimentaire et exemples des espèces impliquées prédominantes (McKay et Baldwin, 1990).

Applications	Espèces utilisées
Fermentations de végétaux	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques variées
Sauce de soja	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Pediococcus soyae</i>
Aliments fermentés Indigènes	Bactéries lactiques variées
Ensilage	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Pain au levain	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>
Produits laitiers Fermentés	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> .

Pour cela diverses stratégies ont été mises en place, il s'agit tout d'abord d'une meilleure sélection des souches et leur utilisation en mélanges complexes dans des levains de culture. Une optimisation métabolique des souches a également été envisagée afin d'augmenter la production d'arômes de polysaccharides, de vitamines ou encore de la protéolyse des protéines du lait. (Ferain et al., 1996 ; Hols et al., 1999 ; Hugenholtz et al., 2000).

2- Biodiversité de la flore lactique chez l'animal laitier

Selon Montel et *al.* (2003) ; Ménard et *al.* (2004), le trayon est le siège d'implantation d'assemblages microbiens d'environnements de ferme et de l'animal. Les investigations de Michel et *al.* (2005) révèlent que c'est à la surface des trayons de l'animal laitier que l'on rencontre la plus grande diversité de groupes microbiens en comparaison avec ce que peut apporter l'ambiance ou la machine à traire. Les travaux menés ces dernières années tendent à montrer que cette microflore est apportée préférentiellement par les trayons et par l'air au cours de la traite. Ainsi, l'environnement en contact avec le trayon est à privilégier (pratiques autour du paillage, autour des trayons (Tormo et *al.*, 2006).

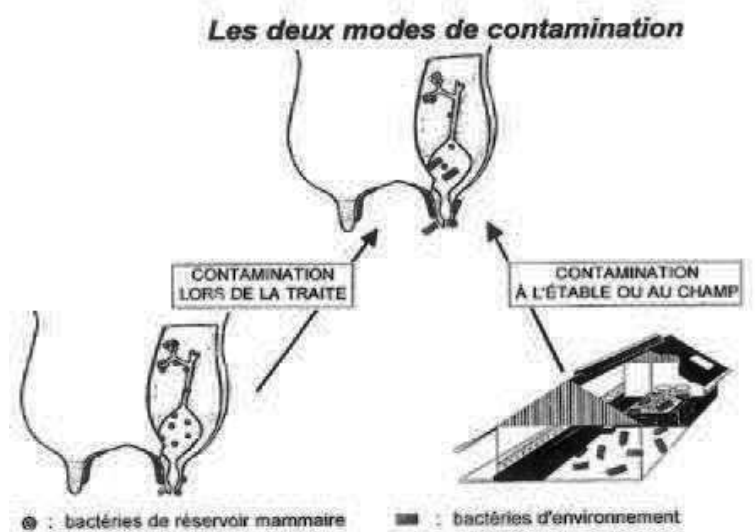


Figure 1 : Mode de contamination du trayon de vache laitière (Gourreau, 1995)

L'anatomie de la peau du trayon est caractérisée par l'absence de poils, de glandes sébacées et de glandes sudoripares, revêtue d'un polysaccharide rendant sa surface propice à toute contamination. En effet les recherches de Michel et *al.* (2001) ; Vacheyroux et *al.* (2011) suggèrent que la peau des trayons est le premier réservoir microbien de l'animal. Cependant Verdier et *al.* (2011) estiment que la connaissance des communautés microbiennes de ce réservoir potentiel de biodiversité des laits n'est que fragmentaire. Ils affirment que les trayons sains et propres sont constitués majoritairement de flores d'intérêts technologiques que ce soit pour les vaches ou pour les chèvres et brebis. Beaucoup de travaux démontrent qu'elle est composée de bactéries d'affinage (*Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Microbacteriaceae*) et de bactéries Gram + non lactiques autres que bactéries d'affinage. Parmi les bactéries d'affinage il y a dominance de *Staphylococci* (9 espèces) et de bactéries lactiques (*Aerococci* et *Enterococci*).

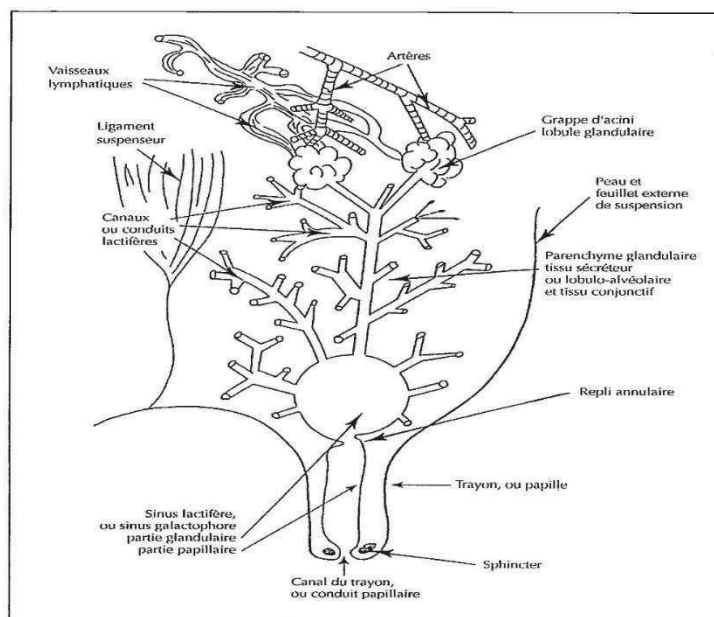


Figure 2 : Anatomie du trayon et de la mamelle chez la vache laitière (Denis et Meyer, 1999)

Selon les mêmes auteurs, par approche classique de culture dépendante et par diagnostic moléculaire direct leur répartition centésimale sur le trayon de vaches laitières est illustrée dans la figure 3 (figure 3 A et 3B).

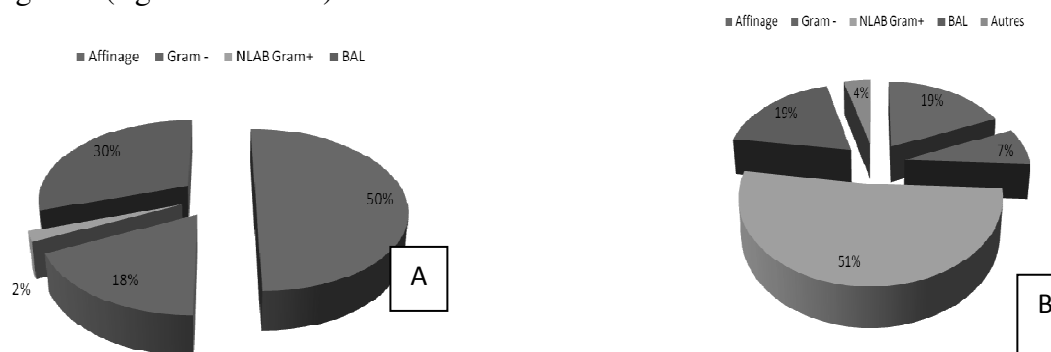


Figure 3 : Distribution de la flore de surface du trayon de vaches laitières par méthode de culture dépendante (A) et par biologie moléculaire directe (B). (Denis et al. 2006)

Une étude réalisée par Denis et al. (2006) sur du lait de vache démontre que les trayons seraient un réservoir potentiel de bactéries de surface (microcoques et corynéformes et de staphylocoques). Des travaux plus récents menés par Vacheyroux et al. (2011) mettent en évidence que cette flore d'intérêt technologique est composée généralement de :

- 30% de bactéries lactiques dominés par les *Aerococci* et les *Enterococci*
- 50% de bactéries d'affinage (*Staphylococcaceae*, *Micrococcaceae*, *microbacteriaceae*)

En revanche, le lien entre lactocoques des trayons et lactocoques du lait n'a pas pu être établi. Concernant les microorganismes présents dans le canal du trayon, une étude de Gill et *al.* (2006) suggère qu'ils sont plus diversifiés que ce qui avait été décrit précédemment. Sur plusieurs échantillons de vaches saines, 45 espèces ont été répertoriées avec une dominance des classes des *clostridies*, *bacilliaceae* et *staphylococcaceae* et plus ponctuellement d'entérocoques.

Les lactocoques et lactobacilles n'ont jamais été retrouvés. Il est probable, également, que des flores présentes ponctuellement dans le canal du trayon contribuent à ensemercer le lait au cours de la traite.

L'analyse microbiologique des laits individuels de chèvre prélevés stérilement (trayons sains préalablement désinfectés) et mis en culture 24 heures à 30°C révèlent la présence de nombreux groupes microbiens avec une dominance de flores d'intérêts.

Les bactéries qui sont normalement présentes y vivent en symbiose. Cette relation avec l'hôte permet aux microorganismes d'occuper les niches microbiologiques et inhibent la colonisation par des organismes pathogènes. Les études actuelles tendent à s'orienter vers des pratiques plus respectueuses des flores.

Ainsi, l'absence de lavage des mamelles ou le lavage collectif, les trayons lavés mais non essuyés, l'absence de post trempage et d'élimination des premiers jets sont plutôt associées à des laits riches en flores d'intérêt technologique (Arnal, 1999 ; Bouton et *al.*, 2005 ; Michel et *al.*, 2005). De plus, l'absence de post trempage et de report du lait vont dans le sens d'une bonne aptitude fromagère des laits (Bérodier, 2001). Ceci est à considérer en conditions d'hygiène maîtrisées.

Lors de la traite ces assemblages organisés en communautés microbiennes sont transférés au lait et constituent son microbiote naturel, reflet caractéristique de la biodiversité de cette biosphère. Par contre, le revêtement cutané à ce niveau subit une forte sollicitation lors de la traite, ce qui le rend aussi très fragile et propice aux affections.

En effet l'action mécanique de la traite aurait comme impact une érosion plus ou moins intense du biofilm bactérien et des lésions cutanées au niveau du trayon et faciliteront ainsi les contaminations secondaires. La flore microbienne du lait cru participe de façon importante à l'établissement des caractéristiques organoleptiques des fromages et ce, indépendamment de la présence des ferments.

Des travaux de plus en plus nombreux montrent que les fromages au lait cru ont en général des saveurs plus marquées et plus typiques. Cependant, aucune relation n'a pu être établie par ces auteurs entre la composition microbienne de ces laits et leurs conditions de production (Bonizzi, et *al.*, 2009). Pour une saison donnée, la stabilité dans la distribution inter-espèces de cette flore lactique est un indice révélateur du fonctionnement normal de l'animal porteur.

Les variations saisonnières seraient à l'origine de variations structurelles au niveau de cette microflore. La persistance ou la non persistance d'espèces lactiques données est en relation étroite à des changements dans les ambiances de vie du cheptel laitier. Très peu d'auteurs ont cherché à caractériser cette flore et surtout à l'étudier dans sa globalité.

Souvent les microorganismes pathogènes ont été essentiellement considérés (Wareing, 2005). Seuls les travaux de Desmasures et *al.* (1997) apportent des informations sur les flores des laits crus destinés à la fabrication de Camembert de Normandie. Ils montrent que la composition microbienne des laits, en particulier pour certains groupes bactériens étroitement impliqués dans la fabrication du Camembert, est globalement stable d'année en année.

Ce n'est que récemment que les chercheurs commencent à s'intéresser à ces aspects et font l'objet d'études de biodiversité plus approfondies par utilisation d'outils d'investigation moléculaires, les méthodes classiques ne se limitent qu'à la mise en évidence des microorganismes cultivables et comme conséquence l'image de la population microbienne est déformée par l'étape de mise en culture.

3 - Les lactocoques : taxonomie et caractéristiques générales

Ce sont des bactéries mésophiles, à Gram positif, dépourvu de catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chainettes. Leur métabolisme est homofermentaire, produisent via la voie des hexoses de l'acide lactique (L+). Le genre *Lactococcus* comprend 6 espèces :

- *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* et *L. lactis*, *L. chungangens*. Cette dernière espèce, *L. lactis*, est divisée en trois sous espèces :
- *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *Cremoris* et *L. lactis* subsp. *Hordniae*. Les lactocoques sont formés d'espèces dont les contenus en G+C varient de 34 % à 43%.

Tableau 2 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (Dellaglio et *al.*, 1994).

Espèces	Croissance dans / à :					Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de :			Voges-Proskauer
	Nacl 2%	Nacl 4%	10°C	40°C	45°C			Arginine dihydrolase	α galactosidase	β galactosidase	
<i>Lc. garviae</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	+	-	+	-	-	-	L(+)	-	-	-	+
<i>Lc. lactis ssp. hordniae</i>	+	-	+	-		-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	v
<i>Lc. plantarum</i>		+	+	v	-	-	L(+)	-	v	-	+
<i>Lc. raffinolactis</i>		-	+	-		-	L(+)	v	+	-	+

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; v : plus de 10% et moins de 90% de réactions positives

Les caractéristiques générales distinctes des différentes espèces et sous-espèces sont détaillées dans le tableau 2. Le génome complet de *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 a été séquencé par Bolotin et *al.* (2002).

L'information génétique de cette souche est stockée sur un chromosome circulaire de 2 365 589 paires de base (pb) codant pour 2 310 protéines. Les gènes codant pour ces protéines représentent 86% du génome. De même, le génome complet de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 a été séquencé par Wegmann et *al.* (2007). Ce génome de 2 529 478 pb contient 81 pseudo gènes et code pour 2 436 protéines.

Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (Dellaglio et *al.*, 1994 ; Corroler et *al.*, 1999). Les lactocoques se retrouvent fréquemment dans les laits crus à des niveaux pouvant varier de 10 à 10³ ufc.ml⁻¹, selon les études et les espèces laitières.

Les niveaux sont supérieurs dans les laits de chèvre et de brebis, comparés au lait de vache (Desmasures et *al.*, 1997a ; 1997b., Michel et *al.*, 2001; Tormo et *al.*, 2006 ; Casalta et *al.*, 2009 ; Mallet et *al.*, 2010). Il est toutefois difficile de comparer les niveaux des lactocoques mentionnés dans les études car les méthodes de dénombrement différent souvent. Parmi les lactocoques, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Corroler et *al.*, 1998 ; Dalmasso et *al.*, 2008).

Tableau 3 : Séquence et taille du génome d'espèce et sous espèces de bactéries lactiques
(Leeuwenhoek, 2002)

Species	Strain	genome size (Mb)	Contact person	Institution
Sequencing completed				
<i>Lactococcus lactis</i>	IL1403	2.3	A. Sorokin	INRA and Genoscope, FR
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	3.3	M. Kleerebezem	WCFS, NL
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	NCC533	2.0	D.Pridmore	Nestlé, CH
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC700396 NCFM	2.0	T. Klaenhammer, R. Cano	North Carolina State University and Cal-Poly Technical University, USA
<i>Bifidobacterium longum</i>	NCC2705	2.3	F. Arigoni	Nestlé, CH
Sequencing ongoing				
<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. cremoris</i>	MG1363	2.6	O.Kuipers, M.Gasson, D. van Sinderen	University of Groningen, NL; IFR, UK; UCC, IRL
<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. cremoris</i>	MG1363	2.4	A. Sorokin, A. Bolotin	INRA, FR
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i>	ATCC11842	2.3	E. Maguin, M.vd Guchte	Genoscope and INRA, FR.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i>	DN-100107	2.1	T. Smokvina	Danone Vitapole, FR
<i>Lactobacillus sakei</i>	23K	1.9	M. Zagorec, S. Chaillou	INRA, FR.
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23	2.6	J. Deutscher, A. Hartke	INRA/CNRS, Caen University, FR
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CNRZ32	2.4	J. Steele	University of Wisconsin, USA
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HN001	2.4	M. Lubbers	Fonterra Research Center (formerly NZDRI) and ViaLactia BioSciences, NZ
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG18311	1.9	P. Hols	UCL, Belgium
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNRZ1066	1.8	A.Bolotin	INRA, FR, Integrated Genomics Inc, USA
<i>Oenococcus oeni</i>	IOEB84.13	1.8	J. Guzzo	Universities Dijon and Bordeaux-INRA-GENOME Express, FR
<i>Bifidobacterium breve</i>	NCIMB8807	2.4	D. van Sinderen	University College Cork (UCC), IRL
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	ATCC6207	2.6	H. Pel, J. Sikkema	DSM Food Specialties, Friesland Coberco Dairy Foods, NL
Joint Genome Institute/Lactic Acid Bacteria Genome Consortium (JGI/LABGC)				
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC33323	1.8	T. Klaenhammer	North Carolina State University, USA
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC334	>2.2	J. Broadbent	Utah State University, USA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i>	ATCCBAA-365	2.3	J. Steele	University of Wisconsin, Madison, USA
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC367	2.0	M. Saier	University of California, San Diego, USA
<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. cremoris</i>	SK11	2.3	B. Weimer, L. McKay	Utah State University and University of Minnesota, USA
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC 8293		F. Breidt, H.P. Fleming	USDA, North Carolina State University, USA
<i>Oenococcus oeni</i>	PSU1 ATCC BAA-331	1.8	D. Mills	University of California, Davis, USA
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ATCC25745	2.0	J. Steele, J. Broadbent	University of Wisconsin, Madison, Utah State University, USA
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ATCC BAA-491	1.8	R. Hutkins	University of Nebraska, USA
<i>Brevibacterium linens</i>	BL2/ ATCC 9174	3.0	B. Weimer	Utah State University, USA
<i>Bifidobacterium longum</i>	DJ010A	2.1	D. O'Sullivan	University of Minnesota, USA

4 - Lactocoques typiques et atypiques

Les interactions entre les microorganismes évoluent en fonction des souches qui sont associées. De plus, elles sont étroitement dépendantes des conditions de l'environnement, en particulier du milieu et des conditions de culture. Cela se comprend aisément, puisque les principales causes d'interactions entre les microorganismes dérivent de leurs propriétés physiologiques, dont l'expression est étroitement dépendante des conditions de culture. Les bactéries lactiques sont des microorganismes exigeants d'un point de vue nutritionnel. (Loubière et *al.*, 1996). Parmi les facteurs responsables d'interactions entre souches, les facteurs nutritionnels prennent donc une place importante. Plus précisément, la croissance des bactéries lactiques dans le lait est principalement régie par leur aptitude à s'approvisionner en acides aminés la nutrition azotée des bactéries lactiques en général, et des lactocoques en particulier, est à l'origine de divers phénomènes d'interactions, dont la nature et les effets varient selon les associations considérées (Desmazeaud, 1983)

5 - Potentiels biotechnologiques

5.1 - Ferments lactiques et utilisations en agro-alimentaire

Les souches de starter classique sont choisies en se basant simplement sur leur capacité de production forte et rapide des acides organiques et leurs propriétés de formation des substances aromatiques (Antara et *al.*, 2004 ; Hughes et *al.*, 2002). Pour les starters de deuxième génération l'action bénéfique sur la rhéologie de l'aliment était prise en compte. Récemment, l'utilisation de nouveaux starters "fonctionnels", d'un grand intérêt industriel et nutritionnel a été mise au point. Ils complètent les apports des starters classiques et concourent à l'amélioration et à l'optimisation du processus de fermentation et de la qualité des produits finis. Il s'agit des microorganismes permettant de bio-conserver des aliments *via* la diminution de la charge microbienne totale ou pathogène du produit, sous l'effet des bactériocines ou des autres substances antimicrobiennes produites (Zdolec et *al.*, 2008 ; Albano et *al.*, 2007). Permettent également d'acquérir des avantages organoleptiques, technologiques ou nutritionnels par leurs propriétés protéolytiques et/ou lipolytiques, leur capacité de production des molécules health – promoting (le cas des cultures starters probiotiques) (Vuyst et *al.*, 2008 ; Pennacchia et *al.*, 2006, 2004 ; Moreno et *al.*, 2006).

Dans le cas des starters fonctionnels, la sélection des souches s'appuie sur les critères plus exigeants et approfondis, telles que : la capacité de production des substances health-promoting (des micronutriments et/ou des substances nutraceutiques, (De Vuyst et *al.*, 2008 ; Leroy et *al.*, 2006). De plus, il est nécessaire de démontrer leur non-possibilité à synthétiser des

amines biogènes et/ou leur absence de résistance aux antibiotiques (Ammor et *al.*, 2007 ; Latorre-Moratalla et *al.*, 2007 ; Leroy et *al.*, 2006 ; Simonová et *al.*, 2006 ; Komprda et *al.*, 2004 ; González-Fernández et *al.*, 2003 ; Suzzi G., et Gardini F., 2003; Ansorena et *al.*, 2002 ; Bozkurt et *al.*, 2002).

Les bactéries lactiques impliquées dans l'industrie alimentaire appartiennent à différents genres : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Vandamme et *al.*, 1996). Le genre *Lactococcus*, qui nous intéresse plus particulièrement, était autrefois apparenté aux streptocoques.

5.2 - Fonctions des ferments lactiques

Le champ d'application des bactéries lactiques est large et plusieurs de leurs propriétés sont importantes et influentes sur la qualité finale des produits alimentaires. Il permet d'assurer la qualité sensorielle des produits et de mieux maîtriser le processus de fermentation (Casaburi et *al.*, 2007 ; Muthukumarasamy et *al.*, 2006). Certaines souches présentent une activité antibactérienne et l'application de souches lactiques bactériocinogéniques peut être considérée comme un outil complémentaire pour prévenir le développement des bactéries pathogènes (Todorov et *al.*, 2007 ; Du Plessis et *al.*, 2004 ; Nieto-Lozano et *al.*, 2002 ; Erkkilä et *al.*, 2001).

Les lactocoques sont largement utilisés dans les fermentations lactiques pour la production d'une diversité de produits alimentaires fermentés et de molécules d'intérêt. Utilisant un métabolisme relativement simple ces bactéries transforment une variété de sucres en lactate et autres acides organiques. Les produits finaux ont une action inhibitrice et même destructive des germes d'altération et contribuent à la saveur du produit final. Ces bactéries lactiques, comme tous les micro-organismes, possèdent un métabolisme soumis à des régulations imposées par les contraintes environnementales. L'isolement et la sélection des microorganismes à partir des milieux naturels restent toujours la meilleure stratégie d'obtention de cultures d'usage commerciale et scientifique pour plusieurs variétés de produits.

L'industrie laitière utilise des souches de culture starter simple ou mixte bien définie. A titre d'exemple au Canada, les ferments utilisés pour fabriquer le fromage Cheddar sont principalement composés de souches de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Celles-ci sont préférées aux souches de *Lactococcus lactis subsp. lactis* grâce à leur grande contribution à la production de saveur (Vedamuthu et *al.*, 1966). Les souches de *L. lactis subsp. cremoris* sont caractérisées par un grand polymorphisme et par une variabilité en ce qui concerne la réponse

aux stress environnementaux, le comportement et la libération de saveurs. Chaque souche possède un potentiel technologique qui lui est propre, les qualités technologiques et les performances étant souche-dépendantes, une des principales problématiques des industriels concerne la reproductibilité de la production et la stabilité de la qualité du produit fini. Il est aujourd'hui indispensable d'être capable de différencier les souches utilisées dans les ferments industriels. Les principaux critères de sélection des souches de ferments sont basés sur les profils phénotypiques, à savoir, l'acidification, la protéolyse, la dégradation d'acides aminés, la lipolyse et la résistance aux bactériophages. D'autres techniques moléculaires incluant les profils plasmidiques et l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE) ont été utilisées pour la caractérisation génotypique et le typage de ces bactéries lactiques.

5.3 - Activité acidifiante

La capacité à produire de l'acide lactique rapidement est essentiellement essentielle pour des souches à usage fromager (Stadhouders, 1974, 1986 ; Sandine 1979, 1985 ; Farrow, 1980 ; NUNEZ et *al.*, 1981 ; Cogan et Daly, 1987 ; Fox et *al.*, 1990 ; Kandarakis et *al.*, 1998). L'activité acidifiante de différents microorganismes starters a été largement étudiée à travers le monde. Cependant peu de travaux ont été publiés sur les cultures starters destinées à l'élaboration de fromages à partir de laits de chèvres la majorité des études se référant à la production de l'acidité finale et peu se sont intéressées à l'acidification pour une longue période.

Les lactocoques constituent la population dominante durant la maturation de plusieurs types de même pour les variétés de fromages d'origines caprine (Tornadijo et *al.*, 1995; ZaÂrate et *al.*, 1997). Dans le groupe des lactocoques seule *Lactococcus lactis subsp. lactis* est la sous espèce isolée du fromage Valdeleja sur milieux M17 et MSE (Alonso-Calleja, 1991). L'activité acidifiante est l'une des principales fonctions des bactéries lactiques. Dans la fabrication des produits carnés fermentés, les bactéries lactiques provenant des matières premières ou de l'environnement sont responsables de la production d'acide lactique résultant de l'utilisation des hydrates de carbone et, par conséquent, de la chute du pH de la viande (Visessanguan et *al.*, 2006 ; Klingberg et *al.*, 2005 ; Papamanoli et *al.*, 2003 ; Bozkurt et *al.*, 2002 ; Hugas et *al.*, 1997). Cette acidification provoque la coagulation des protéines musculaires et induit ainsi la fermeté, la cohésion et le découpage facilité de la viande. En outre, l'accumulation des acides organiques produits inhibe la croissance des bactéries pathogènes et celle de la flore d'altération de la viande (Deumier et *al.*, 2003). Enfin, la maturation est favorisée quand la valeur du pH s'approche du point isoélectrique des protéines et le développement de la couleur est favorisé dans les conditions acides (Hugas et *al.*, 1997). Dans la fermentation homolactique, l'acide lactique est le

produit prépondérant (plus de 95%). Il provient de la réduction de l'acide pyruvique catalysée par la lactate déshydrogénase. Les lactobacilles (*Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*) et les pédiocoques (*Pe. pentosaceus*, *Pe. acidilactici*) sont les bactéries homolactiques prédominantes de la flore lactique naturelle des saucisses séchées fermentées. Parmi ces espèces, les *Lb. sakei* sont plus compétitives que les autres lactobacilles, manifestant une courte phase de latence, un fort taux de croissance et une concentration cellulaire finale plus importante (Ruiz-Moyano et al., 2008 ; Benito et al., 2008 ; Fontán et al., 2007 ; Baruzzi et al., 2006 ; Ammor et al., 2005 ; Papamanoli et al., 2003).

Les bactéries hétérolactiques possèdent le système glyceraldéhyde-P déshydrogénase, mais sont en général dépourvues des autres enzymes de la glycolyse et en particulier de fructose-6Pkinase. Par contre, elles ont une phosphocétolase. Parmi les lactobacilles hétérolactiques, certains sont dits "obligatoires" : ils produisent 50% d'acide lactique à partir du glucose ; d'autres sont dits "facultatifs" : ils produisent 85% d'acide lactique. Les *Lb. brevis*, les *Leuconostoc* (*Le. carnosum*, *Le. mesenteroides*) et les *Weissella* (*We. viridescens*, *We. confusa*) sont les bactéries hétérolactiques retrouvées dans les produits fermentés à base de la viande (Santos et al., 2005 ; Rantsiou et al., 2008 ; Papamanoli et al., 2003).

Les autres bactéries hétérolactiques (*Lb. casei* ou *Lb. paracasei*) y sont, mais à une quantité moindre (Ruiz-Moyano et al., 2008 ; Fadda et al., 1998). Dans la sélection des starters lactiques pour les produits carnés fermentés, les bactéries homolactiques sont généralement préférées aux hétérofermentaires. Ces dernières peuvent causer des défauts au niveau de la texture et/ou de la flaveur des saucisses séchées fermentées (les trous, le goût acide piquant) (Ammor et al., 2007 ; Lee et al., 2006 ; Buckenhüskes et al., 1993). Cependant, pour certains produits, les bactéries hétérolactiques sont utilisées en tant que starters fonctionnels, par exemple : les *Lb. Reuteri* (Muthukumarasamy et al., 2006), les *Lb. casei* (Cenci-Goga et al., 2008) ou les *Leuconostoc* (Papamanoli et al., 2003). Du fait de l'activité acidifiante, la dose d'adjonction des ferments lactiques dépend principalement de leur potentiel à se développer dans le produit cible. Pour la plupart des fermentations de saucisses du type européen par exemple, une valeur aux alentours de 10^6 ufc.g^{-1} est recommandée pour les lactobacilles tandis que des quantités plus élevées (vers 10^8 ufc.g^{-1}) sont conseillées dans le cas des *Lactococcus lactis* (Lücke, 2000).

5.4 - Activité protéolytique

La fermentation, au cours de laquelle plusieurs transformations physiques, biochimiques et microbiologiques se déroulent, est une étape cruciale dans le processus de fabrication des aliments fermentés. En général, les bactéries lactiques ont une faible propriété protéolytique sur par exemple, les protéines myofibrillaires. Toutefois, certaines souches de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* et *Lb. sakei* participent à l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques et par conséquent, contribuent à la décomposition des peptides en acides aminés (Drosinos et al., 2007, Dalmiş et al., 2008 ; Scannell et al., 2004 ; Larrouture et al., 2000). Des peptidases issues de ces bactéries lactiques hydrolysent des oligopeptides et de ce fait, produisent les substances responsables de la flaveur et de la texture des produits fermentés (Ammor et al., 2005 ; Papamanoli et al., 2003 ; Hughes et al., 2002). Par ailleurs les lactocoques possèdent des protéases impliquées dans la coagulation du lait. Selon Jeanson (2009) deux types de protéases agissant sur les caséines sont synthétisées de type I (protéolyse de la caséine β) et de type II (protéolyse des caséines β , α_1 et α_2). Les lactocoques contribuent ainsi à la protéolyse primaire des fromages. Cette action est mineure, la protéolyse primaire étant principalement réalisée par les enzymes natives du lait ou celle de la présure (Grappin et al., 1985). D'autre part, l'autolyse précoce des lactocoques permet la libération d'autres enzymes intracellulaires telles que des protéinases, des peptidases, des lipases ou des estérases. Ces mécanismes d'autolyse dépendent des souches de lactocoques. De nombreuses études ont montré l'impact considérable de ces enzymes sur le développement de la texture et de l'arôme des fromages pendant l'affinage (Carunchia Whetsine et al., 2006 ; Garde et al., 2006 ; Gutierrez-Mendez et al., 2008). *L. lactis* subsp. *lactis*, subsp. *cremoris* et biovar. *diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (Casalta et al., 1995, Lafarge et al., 2004) et pour leur implication dans la formation du goût et de l'arôme pour les deux dernières (Corroler et al., 1999).

5.5 - Activité lipolytique et formation de substances aromatiques

La lipolyse a été largement étudiée dans le domaine alimentaire. Elle joue un rôle important dans la formation des substances aromatiques des produits transformés tels les jambons secs et les saucissons secs. L'addition des lipases exogènes augmente significativement et rapidement la concentration en acide gras libre des produits fermentés, réduisant de ce fait la durée de leur maturation mais sans en améliorer systématiquement leur saveur (Zalacain et al., 1996). Une odeur plus intense a été associée à une augmentation en acides acétique, butyrique et propionique après addition de lipases exogènes (Montel et al., 1998). Les recherches préliminaires sur les saucisses sèches fermentées ont démontré l'importance de la flore

microbienne dans la lipolyse. En effet, il existe une coïncidence entre l'augmentation de la teneur en acides gras libres et la forte croissance des microorganismes lipolytiques appartenant généralement au genre *Micrococcus* ou *Staphylococcus* (*St. xylosum* ou *St. carnosus*) (Montel et al., 1998). Des travaux antérieurs, montrent que les bactéries lactiques occupent une place importante dans l'affinage du *Smen* (aliment traditionnel fermentée prévalent dans l'Afrique du nord), sur les caractéristiques gustatives, aromatiques et rhéologiques de ce produit et leur résistance à l'acidité de long affinage, de ce fait, ils sont considérés comme des agents de maturation (Sakili et Issaoual, 2003). Parmi les bactéries lactiques aromatiques, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* produisent le diacétyle et l'acétaldéhyde, responsable notamment des saveurs caractéristiques du beurre, ils sont produits à partir du pyruvate, issu de la glycolyse et aussi du métabolisme du citrate et de la dégradation des certains acides aminés. Les lactocoques auraient une activité estérasique importante. (Ballesteros et al., 2005).

5.6- Formation des exopolysaccharides

La plupart des microorganismes synthétisent les polysaccharides. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule. D'autres sont des composants de la paroi. Un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule d'où vient le terme "exopolysaccharides" (EPS) ou "polysaccharide exo cellulaire". Deux types d'EPS, soit excrété dans le milieu environnant, soit lié à la surface de la cellule sous forme de capsule, peuvent être produits par certaines bactéries lactiques (Topisirovic et al., 2006 ; Walling et al., 2005 ; Macedo et al., 2002). D'après Lin et al. (2007), la production des EPS dépend des bactéries lactiques. Les travaux sur les polysaccharides bactériens, leur rôle et les conséquences de leur existence ont été d'abord réalisés en recherche médicale.

A l'heure actuelle, l'utilisation des EPS couvre de vastes domaines qui vont de l'industrie alimentaire (en particulier les produits laitiers) et pharmaceutique, à la récupération assistée du pétrole. La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des EPS joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (Welman et al., 2003 ; Ruas-Madiedo et al., 2002). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (Durlu-Özkaya et al., 2007 ; Amatayakul et al., 2006).

L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005). La production du glucane par *Lactococcus lactis* et la production d'un hétéropolysaccharide par les *Lactobacillus curvatus* sont rapportées par Van der Meulen *et al.* (2007).

6 - LES PROBIOTIQUES

Le terme "probiotique" est un mot relativement nouveau qui signifie "en faveur de la vie". Le concept probiotique est né de la théorie de la longévité de Metchnikoff en 1907. Il fut le premier à proposer l'utilisation des Lactobacilles des yaourts pour la restauration du microbiote dans le tractus gastro-intestinal. Les probiotiques ont d'abord été développés dans les années 1960 pour les élevages d'animaux afin de prévenir les infections et stimuler le gain de poids. La première définition officielle a été proposée par Fuller en 1989 qui définit un probiotique comme étant « un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte positivement la santé de l'animal en améliorant sa balance microbienne intestinale ». Cette définition a été révisée plusieurs fois, notamment par la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) et la WHO (World Health Organization). En 2001, leur nouvelle définition s'énonce comme suit : « Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte ».

Les bactéries lactiques sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que « probiotiques ». Il s'agit de micro-organismes vivants qui une fois possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique) (Bourgeois et Larpent, 1996).

De nos jours, les bactéries lactiques ingérés font l'objet de recherches intensives, vont conférer un effet physiologique bénéfique à leur hôte grâce à leurs propriétés microbiennes (Fuller, 1992). Les genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus* abritent des espèces considérées comme probiotiques (Fuller, 1991 ; Gordin et Gorbach, 1992). D'autres bactéries, qui ne colonisent pas naturellement le tractus digestif des mammifères, mais sont utilisées comme starters dans l'industrie laitière sont également considérées comme des probiotiques, *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus*. Leur classification dans les probiotiques ainsi que parmi les microorganismes GRAS (Generally Regarded As Safe) fait de ces bactéries des acteurs potentiellement important dans les domaines de la médecine, de la

chimie et de la santé : amélioration de la digestion du lactose, stimulation du système immunitaire, vecteurs de molécules à effets thérapeutiques.

6.1- Critères de sélection

Les micro-organismes doivent posséder diverses propriétés de survie pour répondre à la définition des probiotiques (Gagnon, 2007). Ils doivent présenter une activité positive et persister durant leur passage dans le tractus digestif. Ces propriétés sont propres à chaque souche et ne peuvent pas être extrapolables d'une souche à l'autre même au sein d'une même espèce (Dunne *et al.*, 2001). Plusieurs critères majeurs de sélection ont été établis par différents auteurs dans le but de sélectionner les souches potentiellement probiotiques. Ces critères, sont répartis en trois catégories à savoir les critères de sécurité, fonctionnels et technologiques. Parmi les critères liés à la sécurité, l'identification taxonomique de la souche est une étape importante dans l'établissement de nouvelles souches potentiellement probiotiques. Chaque souche doit être identifiée par des techniques moléculaires fiables et confrontée à une nomenclature actualisée. Actuellement, le séquençage de la région 16S est la méthode moléculaire de référence pour identifier l'espèce d'une souche, mais cette méthode est longue et requiert une large collection de souches de référence (FAO/WHO, 2002). Le séquençage de l'ARN 16S est une méthode très fiable couramment utilisée pour l'identification des souches probiotiques. Dans ce dernier cas, il est recommandé que la technique soit combinée avec des tests biochimiques et phénotypiques pour s'assurer de la conformité de la souche. L'origine de la souche est également une condition importante car l'interaction spécifique avec l'hôte est maximisée lorsqu'elle provient du même habitat (Alvarez-Olmos et berhelman, 2001). Parmi l'ensemble des critères, l'aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé demeure encore délicat à évaluer dû notamment au fait que les modes d'action par lesquels les probiotiques exercent un rôle fonctionnel *in vivo* sont méconnus (Klaenhammer et Kullen, 1999). La compréhension des mécanismes d'action représente un des défis scientifiques majeurs dans le domaine des probiotiques. D'un point de vue technologique, les souches probiotiques doivent posséder plusieurs critères tels que la facilité à être cultivée tout en conservant leurs propriétés biologiques et leur stabilité au cours des procédés de production et d'entreposage (Champagne, Gardner *et al.*, 2005).

7 - Les substances antimicrobiennes des bactéries lactiques

La propriété des bactéries lactiques à produire des composés antagonistes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les substances antimicrobiennes, est reconnue depuis très longtemps. Par cette capacité, l'utilisation des bactéries lactiques permet de satisfaire

les besoins au point de vue sanitaire en industrie alimentaire (Klaenhammer et *al.*, 1994). Les substances antimicrobiennes produites par les bactéries lactiques peuvent être divisées en deux groupes principaux ceux dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da et ceux à haut poids moléculaire supérieur à 1000Da telle que les bactériocines (Collins et *al.*, 2009). Leur utilisation dans les aliments dans le but de prévenir les altérations et contrer les pathogènes microbiens soit envisageable (Nissen-Meyer et *al.*, 2010). L'acidité, suite de la formation des acides organiques, peut empêcher et même détruire la flore d'altération et de pathogènes des produits fermentés. Sous la forme indissociée, l'acide lactique et l'acide acétique traversent passivement la membrane cytoplasmique et, pour de fortes concentrations d'acides, le milieu intracellulaire peut s'acidifier à un point tel, que les fonctions cellulaires sont inhibées et le potentiel membranaire est annulé (Ammor et *al.*, 2007 ; Deumier et *al.*, 2003). Du point de vue sensoriel, seules de faibles concentrations en acide acétique sont acceptables dans les produits carnés. Cependant, l'effet antimicrobien de celui-ci n'est pas négligeable car pour une même concentration et pour un pH identique, il est plus efficace que l'acide lactique. La sensibilité à ces acides dépend des bactéries et de l'action simultanée d'autres facteurs tels que : l'activité de l'eau et la présence ou non des nitrites (Lücke, 2000).

De nombreuses publications font état de production des bactériocines par les bactéries lactiques. Ces composés inhibent *in vivo* la croissance des germes pathogènes rencontrés dans les industries agro-alimentaires. Les bactériocines telles que la plantacine (produite de *Lb. plantarum*), la curvacine (de *Lb. curvatus*), la leucocine (de *Leuconostoc*), la pediocine (de *Pediococcus acidilactici*) ou la nisine (de *Lactococcus*) ont démontré leur efficacité vis-à-vis des *Clostridium* subsp (Albano et *al.*, 2007 ; Todorov et *al.*, 2007 ; ; Drosinos et *al.*, 2006 ; Dicks et *al.*, 2004 ; Työppönen et *al.*, 2003 ; Nieto-Lozano et *al.*, 2002 ; Scannel et *al.*, 2001 ; Aymerich et *al.*, 2000). L'utilisation des ferments producteurs de bactériocines a également été étudiée. Dans le domaine des produits carnés, la nisine demeure la seule bactériocine utilisée industriellement et elle reste souvent l'outil de choix pour une action préservatrice "naturelle" (Topisirovic et *al.*, 2006 ; Morisset et *al.*, 2005).

7.1 - Substances antimicrobiennes à faible poids moléculaire

Les principales molécules actives contre les microorganismes pathogènes et d'altération sont les acides lactique et acétique, le peroxyde d'hydrogène et enfin le diacétyle, l'acétaldéhyde et l'acétoïne. Ces métabolites sont cumulés dans leur environnement à des niveaux et des proportions dépendant de l'espèce de bactérie lactique et de la composition chimique du milieu. Et de l'environnement physico chimique (Lindgren et Dobrogosz 1990 ; Vanderbergh, 1993 ;

Lorca et *al.*, 2009). Parmi les bactéries lactiques homofermentaires, les espèces du genre *Lactococcus* fermentent les hexoses et produisent exclusivement de l'acide lactique. Par mole de glucose correspondant à un rendement de 0,90g/g de substrat, en condition non limitante les lactocoques produisent deux moles d'ATP et deux moles d'acide lactique. En conditions sub-optimales (limitation en glucose par exemple) le niveau du fructose 1,6 phosphate intracellulaire (activateur essentiel de la LDH) baisse et les bactéries empruntent la voie de la fermentation mixte produisant simultanément de l'éthanol de l'acide formique, acétique en plus de l'acide lactique (Thomas et *al.*, 1979). Les pentoses sont fermentés de la même façon vu que la phosphocetolase est généralement inductible par les pentoses. Ils débitent des quantités équimolaires d'acide lactique et d'acide acétique. Les quantités et le type d'acides produits en cours de fermentation influencent l'activité microbienne ultérieure dans la matière fermentée. L'acide acétique par exemple possède un fort antagonisme contre les levures (Daechel et *al.*, 1987). L'effet inhibiteur des acides organiques est principalement dû aux formes non dissociées qui diffusent à travers la membrane cellulaire en direction du cytosol plus alcalin et interfèrent avec les fonctions métaboliques essentielles. L'effet toxique de l'acide lactique et acétique inclut la réduction du pH intracellulaire et la dissipation du potentiel membranaire (Lindgren et Dobrogosz, 1990 ; Lorca et *al.*, 2009). L'activité antimicrobienne du peroxyde d'hydrogène est attribuée à sa puissance dans l'oxydation des cellules bactériennes et à la destruction des structures de base des protéines cellulaires (Lindgren et Dobrogosz, 1990) La sélection ou la production par génie génétique des souches hyperproductrices d'H₂O₂, agent majeur de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques, pourrait déboucher vers la bio préservation des aliments notamment dans l'inhibition de la croissance des psychrophiles et des pathogènes en cours d'entreposage en conditions de réfrigération (Villegas et Gilliland, 1998). Les bactéries lactiques par décarboxylation du pyruvate produisent de l'acétaldéhyde actif. Ce dernier se condense avec le pyruvate formant de l' α acétolactate qui est ensuite converti en diacétyle par l'acétolactate synthétase. Le produit final de la décarboxylation de l' α acétolactate et la réduction du diacétyle est l'acétoïne (Jyoti et *al.*, 2003 ; Collins et *al.*, 2009). Ces substances sont produites in situ dans les produits fermentés et participent avec les autres substances à préserver l'intégrité de la matrice alimentaire et assurer son innocuité (Vanderbergh, 1993).

7.3 - Substances antimicrobiennes à haut poids moléculaire

Les bactériocines

La biosynthèse des bactériocines est un caractère recherché dans la sélection de souches de bactéries lactiques comme mécanisme d'exclusion de pathogène dans les aliments fermentés et l'environnement gastro-intestinal. Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. La plus récente les considère comme étant les substances de nature protéique d'origine bactérienne (peptides, protéines, ou complexes de protéines ayant une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice. (Spectre restreint) ou d'espèces éloignées (spectre large) (Mills et *al.*, 2011). Les bactériocines sont secrétées naturellement par plusieurs variétés de bactéries dans le but d'éliminer les autres bactéries envahissantes. Ces substances biologiquement actives sont synthétisées au niveau du ribosome et les gènes codant pour leur structure sont généralement associés à des plasmides, leur sécrétion dans le milieu extracellulaire étant conférée par un système de transfert (Gálvez et *al.*, 2007 ; Riley et Chavan, 2007 ; Khalil et *al.*, 2009 ; Tabasco et *al.*, 2009). On a d'abord attribué aux bactériocines un spectre d'activité limité aux bactéries taxinomiquement proches de la bactérie productrice (Tagg et *al.*, 1976, Klaenhammer, 1988). Nous savons aujourd'hui que certaines bactériocines possèdent un large spectre d'activité qui inclut des bactéries éloignées au point de vue phylogénétique (Baliarda ,2003 ; Mami et *al.*, 2008 ; Dortu et Thonard, 2009 ; Gong et *al.*, 2010 ; Naghmouchi et *al.*, 2010).

7.4 - Classification

Quatre classes de bactériocines ont été définies chez les bactéries lactiques on se basant sur des caractéristiques communes, principalement sur leur structure primaire, leur poids moléculaire, leur mode d'action, leur stabilité thermique et leurs propriétés génétiques (Klaenhammer, 1993 ; Drider et *al.*, 2006).

Classe 1 : Lantibiotiques (<5 kDa), Petits peptides thermostables résultant de la formation de contenant de la lanthionine, formées d'un ou deux peptides, secrétés sous la forme biologiquement inactive de pré-peptide qui subissent une modification post-translationnelle pour être actifs.

Classe II : Non-Lantibiotiques (<10 kDa), petits peptides thermostables ne contenant pas de lanthionine, incluant pediocine like ou *Listeria*-active bactériocines (classe IIa), bactériocines a deux-peptides (class IIb) et bactériocines circulaires (classe IIc). Les bactériocines de la Classe IIa sont caractérisées par l'occurrence de région N-terminal hydrophile et chargée hautement

conservée ayant des jonctions par liaison disulphide. Ces molécules montrent un grand intérêt très prometteur et sont des candidats attractifs pour leur utilisation comme bio conservateurs dans l'industrie alimentaire.

Classe III (sup a 30 kDa) ou Bactériolysines ou grosses protéines lytiques thermolabiles, souvent des mureines hydrolases (classe III).

Classe IV bactériocines qui requièrent une fraction non protéique (lipide, carbohydate) pour leurs activités.

7.5 - Mode d'action

La plupart des bactériocines des bactéries lactiques appartiennent à la classe I et II. Ce sont des peptides cationiques (dû à la présence de lysine, arginine et histidine) hydrophobique à pH neutre, (par la présence des acides aminées suivants : alanines, valine, leucine, isoleucine, proline, méthionine, phénylalanine et tryptophane) et amphiphiliques, par la contenance de 20 à 60 aminoacides (Diep, 2002). L'activité des bactériocines est liée à leurs propriétés pendant leur action sur la membrane cytoplasmique. Les charges positives des protéines se lient aux charges négatives des phospholipides mettant une partie de la membrane cellulaire sensible. Cette distribution des bactériocines au travers la membrane est favorisée par leur nature amphipathique (Riley, 2011).

La majorité des bactériocines inhibent les bactéries par formation de pores dans la membrane cellulaire et la dissipation de la force proton motrice. Les bactéries à Gram-négatif sont protégées de l'effet létal des bactériocines par la présence membrane externe. Au contact de la membrane cible, que la moitié de leur N terminal cationique forme une structure ressemblant au feuillet se lie à la surface de la cellule cible, pendant que la partie hélicoïdale plus hydrophobique contenant le C-terminal pénètre à moitié dans le noyau hydrophobique de des membranes la cellule cible et apparemment se lie à la perméase mannose phosphotransferase créant des fuites dans la membrane. Des analyses structurales récentes de bactériocines à deux peptides indiquent qu'elles forment une structure hélice- hélice qui pénètre dans les membranes cellulaires. Aussi ces bactériocines peut être agissent en se liant à l'intégrité des protéines de la membrane. Certaines bactériocines de la Classe I ont montré qu'elles possèdent un mode d'action double et ont la capacité de se lier au lipide II causant de ce fait la mort cellulaire résultant du blocage de la synthèse paroi cellulaire. En outre elles sont capables de causer la mort rapide des cellules quand elles utilisent le lipide II, et forment des pores dans la membrane. La nature amphiphilique des bactériocines de la Classe II créent une facile insertion dans la

membrane des microorganismes sensibles causant la dépolarisation et la mort (Riley, 2011). La puissance de la bactériocine sur la cellule cible hôte dépendra de différents facteurs :

1. La charge microbienne du contaminant, plus elle est élevée et plus la concentration nécessaire en bactériocine pour tuer les cellules cibles est élevée.
2. les cellules non actives en croissance peuvent être plus résistantes aux bactériocines.

3. Changement du microorganisme cible en réponse aux facteurs du stress environnemental qui peut être aussi à l'origine d'une baisse de sensibilité aux bactériocines. Les formes inactives de la bactérie (endospores) pourraient résister aux bactériocines. Les traitements technologiques peuvent provoquer la germination sporale et une excroissance, et suite à cela une augmentation de la sensibilité à la bactériocine. Vu que la production est associée à la croissance cellulaire, tout facteur affectant la croissance peut affecter également la sensibilité à la bactériocine à sa production comme les substances inhibitrices (sels, nitrites ou la carence en nutriments biodisponibles (comme le manganèse dans le cas de plusieurs cas de bactéries lactiques). Comme exemple la production d'enterocines A et B par *Enterococcus faecium* CTC492 est significativement inhibée par les ingrédients de la sauce et des additives, à l'exception des nitrates (Riley, 2011).

7.6- Propriétés

La température, le pH, la digestion enzymatique et les agents dissociant sont les principaux facteurs qui affectent la stabilité des bactériocines. La plupart des bactériocines peuvent être lyophilisées sans perte importante dans leur activité mais des exceptions sont connues (Houlihan et Russell, 2006). Certaines bactériocines sont thermolabiles (Oh et *al.*, 2000 ; Moghaddam et *al.*, 2006 ; El-Shouny, 2006). D'autres sont thermostables montrant une stabilité remarquable a des traitements thermiques élevés même en conditions d'autoclavage (Vingt minutes/121°C) (Khalid et *al.*, 1999 ; Ogunbanwo et *al.*, 2003 ; Sarika et *al.*, 2010). Les variations de pH ont un effet marquant sur la stabilité des préparations bactériocinogéniques. La température, le pH, la digestion enzymatique et les agents dissociant sont les principaux facteurs qui affectent la stabilité des bactériocines. La plupart des bactériocines peuvent être lyophilisées sans perte importante dans leur activité mais des exceptions sont connues (Houlihan et Russell, 2006). Certaines bactériocines sont thermolabiles (Oh et *al.*, 2000 ; Moghaddam et *al.*, 2006 ; El-Shouny, 2006).

D'autres sont thermostables montrant une stabilité remarquable a des traitements thermiques élevés même en conditions d'autoclavage (Vingt minutes/121°C) (Khalid et *al.*, 1999

; Ogunbanwo et al., 2003 ; Sarika et al., 2010). Les variations de pH ont un effet marquant sur la stabilité des préparations bactériocinogéniques. Les Bactériocines et les bactériocines like sont stables a pH neutre et tolèrent mieux les conditions acides que les conditions alcalines extrêmes (Gwiazdowska et Trojanowska, 2006 ; Joshi et al., 2006).

A titre d'exemple la plantaricine ASM1 de *Lactobacillus plantarum* A-1 (Hata et al., 2010) et la bactériocine G2 produite par *Lactobacillus plantarum* G2 (Šeatović et al., 2011) les deux montrent une stabilité élevée de pH 2 à 9. Ogunbanwo et al. (2003) et Hernandez et al. (2005) rapportent que les agents dissociant tel que le Sodium dodecyl sulphate, le tween 80, le Triton X-100 et l'urée affectent la stabilité de plusieurs bactériocines. Les enzymes protéolytiques comme la Trypsine, la Pronase, la pepsine et la papaïne détruisent l'activité de différentes bactériocines (Dündar, 2006 ; Pascual et al., 2008). Les bactériocines se fixent spécifiquement aux récepteurs à la surface des cellules cibles et les tuent par altération des liaisons membranes - enzymes, destruction du potentiel membranaire par la formation de pores ou par digestion enzymatique du RNA et/ou DNA. La nature protéique de ces molécules ainsi que leur naturelle occurrence dans la nature ont fait ces peptides bactériens possèdent une activité spécifique à l'encontre d'espèces compétitive et miment les carbohydrates et/ou les lipides (Venugopal et al., 2011).

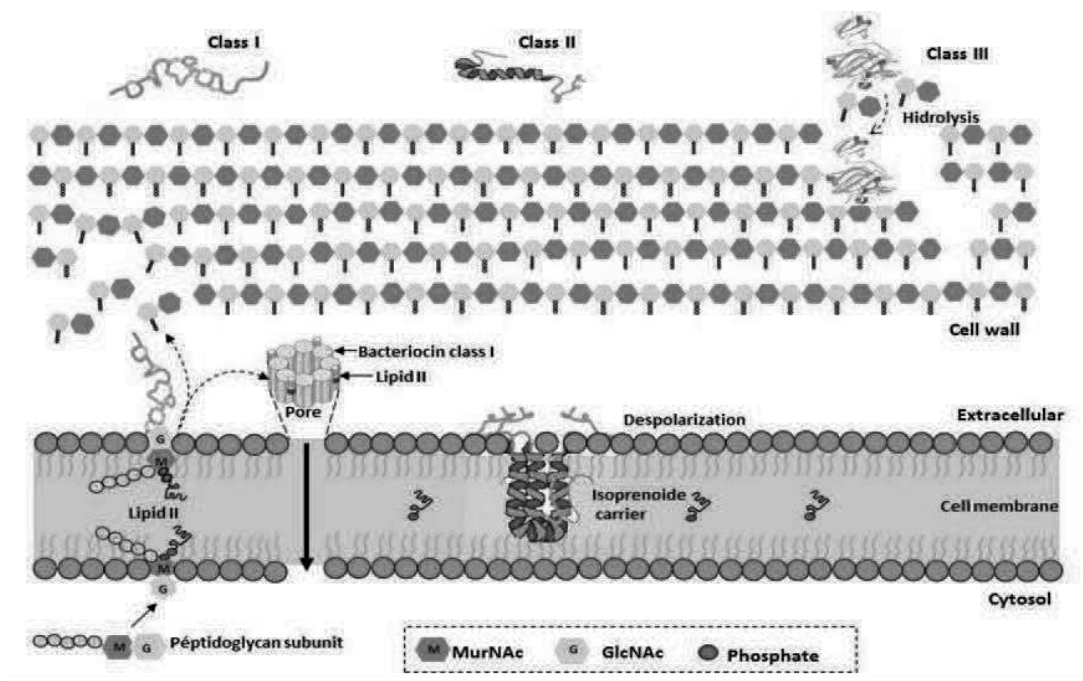


Figure 4 : Mode d'action des bactériocines des bactéries lactiques (Aymerich et al., 2000 ; Martínez et al., 2000 ; Breukink et al., 2006 ; Alvarez et al., 2011).

8 - Production biotechnologique de métabolites de bactéries lactiques

8.1- L'acide lactique

L'acide Lactique est un acide organique qui fut mis en évidence pour la première fois dans le lait par Scheele en 1789 et dénommé «acide lactique» par Lavoisier en 1847. Blondeau (1847) et ensuite Pasteur (1857), découvrent son origine fermentaire par certaines bactéries. En 1881 commence aux états unis pour la première fois la production industrielle de l'acide lactique par voie de synthèse chimique pour les besoins essentiels de l'industrie du cuir et du textile.

L'acide lactique ou acide 2-hydroxypropionique, ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) existe sous deux formes d'isomères optiques le L(+) acide lactique et le D(-) acide lactique. L'isomère L(+) est classée comme GRAS et utilisée comme additif alimentaire par contre l'isomère D(-) est considéré comme nuisible au métabolisme humain, peut provoquer acidose et décalcification. Les deux formes L(+) ou D(-) optiquement pures peuvent être obtenues par voie de fermentation microbienne sur substrats naturels quand le microorganisme approprié est capable de biosynthétiser uniquement l'une des formes isomérique recherchée. La production biotechnologique de l'acide lactique, connaît actuellement un fort regain d'intérêt, puisqu'elle offre une alternative à la pollution environnementale causée par l'industrie pétrochimique ainsi qu'aux ressources limitées de cette industrie.

L'acide lactique est maintenant considéré comme la substance chimique la plus utilisée ; dans l'industrie alimentaire comme conservateur, acidulant, agent de saveur, dans les industries du textile, du pharmaceutique et chimique comme matière première pour la production d'esters de lactates, de propylène glycol, de 2,3 pentanedione, d'acide acrylique, d'acide propanoïque, de dilactide et d'acétaldéhyde. La demande en acide lactique a augmenté considérablement à cause de son utilisation comme monomère dans l'industrie du polylactate (PLA) bioplastique biodégradable (Young et *al.*, 2006 ; Panesar et *al.*, 2010). La demande mondiale est estimée autour de 130 000 à 150 000 tonnes (métrique) par an. De plus la consommation globale en acide lactique croît rapidement, en effet les fabricants du PLA enregistrent une demande au environ de 500 000 tonnes (métrique) depuis l'année 2010 (Ilmen et *al.*, 2007 ; Majid et *al.*, 2010). Le procédé Biotechnologique de production de l'acide lactique inclue souvent la fermentation lactique et la récupération et/ou la purification.

Beaucoup de recherches sont orientées dans le développement de bioprocédés plus efficaces et plus économiques. Les microorganismes capables de produire l'acide lactique sont les bactéries et des champignons. L'essentiel des recherches récentes s'intéressent à l'utilisation de bactéries lactiques les champignons filamenteux. Ces derniers présentent l'avantage de nécessiter des milieux simples et des activités enzymatiques qui les rendent capables de transformer directement les substrats complexes tels l'amidon en L (+) acide lactique c'est le cas de *Rhizopus*, qui utilise par voie aérobie le glucose pour produire l'acide lactique (Miura et al., 2003) et les espèces de *Rhizopus* comme *R. oryzae* et *R. arrhizus* possèdent des enzymes amylolytiques.

L'inconvénient majeure des fermentations fongiques est qu'elles requièrent des aérations vigoureuses liées au métabolisme exclusivement oxydatif. De plus les fermentations lactiques fongiques sont caractérisées par des productivités en acide lactique faibles (inférieures à 3 g/L·h), probablement dû aux faibles vitesses des réactions à cause des limitations de transfert de masse. Les faibles rendements sont également partiellement attribués à la formation de sous-produits tel que l'acide fumarique et de l'éthanol (Yin et al., 1997 ; Oda et al., 2002).

8.2 - Les technologies de fermentation par cellules immobilisées

La technologie des cellules immobilisées n'est pas récente. C'est un procédé traditionnel utilisé, par exemple, dans la production du vinaigre par des bactéries acétiques immobilisées sur des copeaux de bois (Ramakrishna et Prakasham, 1999) ou dans la production du Kéfir avec des levures co-immobilisées avec des bactéries lactiques (Champagne et al., 1994). L'immobilisation permet de retenir les cellules microbiennes dans un système de fermentation et d'obtenir des hautes densités de biomasse.

Cette technique comporte de nombreux avantages, mais aussi des inconvénients, comparés à des procédés utilisant des cellules libres. Les avantages majeurs sont, sans doute, une productivité augmentée de la fermentation et une rétention des cellules, même à de hauts taux de dilution (Champagne et al., 1994). D'autres avantages sont une réutilisation possible des cellules, une protection contre des forces de cisaillement et une stabilité biologique élevée, lors de fermentations en continu (Lamboley et al., 1999). De plus, il est possible que les systèmes avec des cellules immobilisées soient moins susceptibles aux attaques des bactériophages (Champagne et al., 1994) et à la contamination microbienne (Navrátil et Sturdíc, 1999).

La haute densité cellulaire et un microenvironnement différent des conditions dans le milieu de culture résultent souvent en un changement morphologique et physiologique de la culture. Ceci peut représenter un avantage, par exemple en augmentant la tolérance de la souche envers des substances inhibitrices ou en découplant la croissance bactérienne de la production de métabolites (Norton *et al.*, 1994), ou un désavantage car le métabolisme pourrait être modifié de façon non voulue. En raison des avantages importants de cette technologie, comparée avec des cultures utilisant des cellules planctoniques, plusieurs techniques d'immobilisation ont été développées. Toutes ces techniques imitent ce qui se passe dans la nature, où les cellules des microorganismes croissent presque toujours dans un biofilm, associées entre elles et avec des surfaces (Dunne, 2002).

Afin d'immobiliser des cellules, on peut les attacher à des surfaces, les inclure dans des matrices poreuses, les retenir derrière des barrières ou les faire flocculer. Un autre moyen d'immobilisation est l'inclusion des cellules dans une matrice poreuse qui peut être soit un gel, soit un support préformé. Dans le premier cas, la matrice poreuse est formée *in situ* autour de la cellule. Avec cette technique, les cellules sont incluses dans un polymère. Ensemble, ils forment le biocatalyseur avec lequel la fermentation est exécutée. Ce biocatalyseur est souvent obtenu par dispersion d'une solution de polysaccharides et/ou de protéines contenant les cellules et ensuite par solidification de cette solution. La dispersion peut être réalisée par extrusion ou par émulsification. Une bonne vue d'ensemble de ces procédés est donnée par Groboillot *et al.* (1994), Champagne *et al.* (1994), Prenosil *et al.* (1995).

Dans le cas d'un support poreux préformé, on ajoute la matrice d'immobilisation au début d'une fermentation. On laisse diffuser les cellules dans les espaces libres du support où elles commencent à proliférer. Puisque la croissance des colonies est rapidement limitée par le support et les colonies voisines, elles sont alors retenues dans le biocatalyseur (Karel *et al.*, 1985). L'intérêt porté récemment à l'immobilisation naturelle des cellules sous forme de biofilm dans le domaine des fermentations a vu de considérables développements.

Beaucoup d'études ont rapportées l'effet bénéfique d'associer les biofilms comme méthode industrielle dans la production d'aliments, le traitement des eaux usées par exemple. La formation des biofilms est un phénomène naturel dans lequel les cellules microbiennes s'adsorbent sur le support sans faire intervenir de molécules chimiques ou de polymères pour fixer les cellules.

L'attachement ou l'adhésion cellulaire sera uniquement dépendante de l'environnement du réacteur, du microorganisme et des caractéristiques du support. L'immobilisation et l'accumulation des cellules microbiennes sur le support poreux seront principalement dues à la rétention stérique (Suzanne et *al.*, 2010). Les forces participant à l'adhésion d'une cellule au support sont la force de Van der Waals, les liaisons ioniques, les ponts hydrogènes et les interactions covalentes.

Pour comprendre les mécanismes de l'adsorption microbienne, la structure de la paroi cellulaire doit être connue. La distribution des groupes carboxyliques et aminés dans les composantes de la paroi déterminent la charge de la cellule. En général, la plupart des microorganismes sont chargés négativement. Également, un grand nombre d'EPS et ainsi de capsules portent une charge légèrement négative. Pour cette raison, il est préférable d'utiliser des supports chargés positivement.

Afin d'obtenir des biomasses immobilisées élevées, les surfaces intérieures ainsi qu'extérieures doivent être accessibles pour les cellules et les supports avec une porosité élevée sont les plus appropriés. Au début, les forces d'adhésion décrites précédemment, déterminent la vitesse de la colonisation du support. Quand les premières cellules sont adhérentes et les colonies se sont formées, le diamètre des pores du support devient important.

Il existe une grandeur idéale de pores qui est déterminée par un équilibre entre deux effets : les pores doivent être assez grands pour permettre la pénétration et la croissance des cellules à l'intérieur de la matrice, mais ils doivent être assez petits pour empêcher la perte des cellules en croissance (Prenosil et *al.*, 1995). La grandeur optimale des pores pour plusieurs microorganismes ont déterminés par Messing et *al.* (1979). Ils ont trouvé un rapport optimal pour les bactéries de 4 à 5 entre la taille du pore et celle de la cellule.

L'utilisation des supports avec des pores plus grands que 100 μm représente une forme d'immobilisation se situant entre la floculation et l'inclusion (Karel et *al.*, 1985). La matrice du support protège les cellules contre les forces de cisaillement à l'extérieur du biocatalyseur tout en permettant une bonne diffusion des nutriments et des produits métaboliques (De Backer, 1996).

Tableau 4 : Avantages et désavantages de la technologie des cellules immobilisées.

AVANTAGES	DÉSAVANTAGES
<ul style="list-style-type: none"> • Productivité augmentée à cause d'une densité de biomasse plus élevée • Lavage de la biomasse du réacteur empêché pendant la fermentation continue, même avec un taux de dilution élevé • Stabilité biologique et physique des cellules plus élevée en raison de la protection par le support • Découplage de la croissance et de la production de métabolites • Coût réduit pour le traitement en aval du milieu • Rendements plus élevés pour la production de métabolites secondaires • Rétention élevée des plasmides chez les cellules qui en possèdent • Protection contre certains effets inhibiteurs dans le milieu • Susceptibilité diminuée contre l'attaque des phages et des contaminants • Métabolisme peut être modifié par l'immobilisation 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules peuvent se séparer du support et ainsi contaminer le produit • Stabilité mécanique et chimique de certains supports peuvent être insuffisants (cisaillement, dissolution, décomposition par le produit) • Prolifération cellulaire peut détruire la matrice du support et les cellules se libèrent par la suite • Limitations de diffusion peuvent restreindre la bioconversion • ICT peut être trop chère pour une utilisation à grande échelle • Métabolisme peut être modifié par l'immobilisation • Nécessite d'ajouter une étape de production des cultures immobilisées au procédé • Nécessite d'entreposer les cellules ou de prévenir leur mortalité lors des périodes d'arrêt de production • Complexité de l'assainissement du bioréacteur si des contaminations se produisent

Ce procédé d'immobilisation n'est pas nuisible pour la prolifération des cellules, comme ça peut être le cas pour certaines techniques d'inclusion dans des billes de polymères formées *in situ*. Cependant, les densités de cellules sont en général moins élevées qu'avec l'inclusion *in situ* (Klein et Vorlop, 1985). En raison de la forte résistance du support à la compression, cette méthode d'immobilisation est adéquate pour l'utilisation dans des réacteurs comme le réacteur

agité ou le réacteur de type lit fixe. Les supports solides sont en général physiquement et chimiquement résistants envers l'usure par la croissance des microorganismes, ils sont souvent stérilisable par la vapeur et réutilisable. Il existe des exigences concernant la nature du support quant à l'utilisation de la technologie de cellules immobilisées dans l'industrie agroalimentaire. Premièrement il ne doit pas être toxique ni pour l'homme ni pour les bactéries et son utilisation dans le domaine alimentaire doit être permis. En outre, il doit montrer des propriétés physiques et chimiques favorisant l'immobilisation.

Un support caractérisé par sa densité, sa taille et sa forme, sa résistance à la friction, sa capacité de rétention des cellules (diamètre des pores et porosité) et sa charge de surface. De plus, il doit être bien sur stérilisable. La simplicité du procédé et le faible coût rendent l'immobilisation par adsorption sur des supports solides poreux très intéressante pour l'application industrielle (Goncalves et *al.*, 1992 ; Kourkoutas et koutines, 2006 ; Mirdamadi et *al.*, 2008). Par exemple Senthuran et *al.* (1997) ont choisi des billes de verre (foam-glass-particles, Pora-bact A®) pour immobiliser *Lb. casei*. Ils ont comparé ce matériel avec les mêmes billes prétraitées avec du polyéthylène imine et ont constaté, d'une part, un rallongement de la phase de latence et, d'autre part, une rétention des cellules améliorée. Gonçalves et *al.* (1992) ont comparé des supports inertes en verre et en céramique en utilisant un réacteur en régime turbulent en continu avec recyclage.

Les supports se sont distingués quant à la densité, au diamètre des particules, et des pores et à la porosité. Les auteurs ont observé un meilleur attachement en conduisant des fermentations en continu, comparé avec un procédé en batch et ont identifié un support en verre aggloméré (Sikug) et un support en céramique (Bi86) comme étant les supports avec la capacité de rétention de biomasse la plus élevée.

8.3 - Effets physiologiques et morphologiques de l'immobilisation

L'immobilisation cellulaire résulte pour les bactéries immobilisées en des conditions environnantes différentes de celles des cellules planctoniques. Une limitation du transfert de masse crée un microenvironnement autour des cellules affectant la diffusion de nutriments vers la cellule mais aussi l'élimination des produits comme l'acide lactique (Champagne et *al.*, 1994). Les propriétés du support, les conditions hydrodynamiques dans le fermenteur, mais aussi la production et l'excrétion de substances extracellulaires, en particulier des EPS, sont des facteurs qui affectent la résistance à la diffusion (Karel et *al.*, 1985). L'accumulation des produits métaboliques peut diminuer le taux de croissance et changer la physiologie et la morphologie des

bactéries lactiques immobilisées (Cachon et *al.*, 1998 ; Champagne et *al.*, 1994 ; Krishnan et *al.* (2001). Karel et *al.* (1985) ont déjà constaté que la voie métabolique des cellules attachées à des surfaces peut être différente de celle des cellules libres. Des travaux plus récents ont démontré l'existence de mécanismes de reconnaissance de surface pour les bactéries (Prigent-Combaret et *al.*, 1999 ; Wen et Burne (2002) et des changements physiologiques dus à la présence de surfaces (O'Toole et *al.* 2000a ; 2000b ; Parsek et Greenberg, 2000 ; Rashid et *al.*, 2002). Entre-temps, plusieurs travaux ont rapporté de tels changements lors des fermentations avec des cellules immobilisées, notamment une tolérance accrue envers l'inhibition par le produit (Fortin et Vuilleumard, 1989 ; Krisch et Szajani, 1997 ; Teixeira de Mattos et *al.*, 1994) ou même envers d'autres facteurs de stress environnementaux (Doleyres et *al.*, 2002a ; Jouenne et *al.*, 1994 ; Keweloh et *al.*, 1990 ; Trauth et *al.*, 2001).

On peut citer des travaux de Norton et *al.* (1994a) dans la production d'acide lactique ou des productivités élevées et une stabilité à long terme (plus de 100 jours ont été obtenus durant la fermentation continue du lactosérum supplémenté en extrait de levures par *Lb. helveticus* immobilisé dans le lit de κ -carrageenan en billes en conduite mono étagée, avec une conversion limitée du lactose.

En double étage des productivités en acide lactique dépassant 13.5 g l⁻¹ h⁻¹ ont été atteintes avec un très faible taux de surs résiduels au taux de dilution de 0,27 h⁻¹. Schepers et *al.* (2006) obtiennent des productivités allant de 19-22 g/l.h par conduite en réacteur à lit fixe à deux étages avec apport périodique d'extrait de levures.

Le facteur limitant majeur dans l'usage des bactériocines comme bio conservateurs est leur faible rendement durant la production. La technologie d'immobilisation cellulaire a été utilisée toujours par culture sur lactosérum enrichi. Une production très élevée en nisine Z de l'ordre de 8200 UI ml⁻¹A, avec 1 UI = 1 international unit de nisine = 0.025 μ g nisine pure) a été déterminée dans le bouillon après un cycle de une heure en cycle répété en batch à pH contrôlé (RCB) par les cultures de *Lactococcus lactis subsp. lactis* biovar. *Diacetyllactis* UL719 immobilisées en κ -carrageenan/LBG lit de gel en billes correspondant à une productivité volumétrique de 5730 UI ml⁻¹ h⁻¹ ou approximativement 150 mg l⁻¹ h⁻¹ (Bertrand et *al.*, 2001). Cette productivité est plus élevée que le maximum de productivités en nisine rapporté en littérature (approximativement 500 UI ml⁻¹ h⁻¹) ou le maximum de productivités obtenues à l'aide de la même souche UL719 en mode de cultures à cellules libres en batch (850 UI ml⁻¹ h⁻¹), et cellules libres en continu (460 IU ml⁻¹ h⁻¹) ou mode de culture immobilisée en continu (1760 IU ml⁻¹ h⁻¹). La stabilité des cultures en RCB a été maintenue durant 25 et 36 cycles pendant des

périodes allant de trois à six jours, respectivement. Des modes de conduites de fermentations similaires en IC-RCB ont été utilisées avec succès pour la production de concentration élevées en pediocine par *P. acidilactici* UL5 (Naghmouchi, 2003).

Matériels et méthodes

1- Matériels biologiques

1.1- Le lait

Les exploitations sélectionnées sont localisées dans les trois étages bioclimatiques du bassin laitier, les populations animales sont retenues après confirmation de leur état de santé. Elles sont constituées de la population ovine ARABYA qui tire son origine d'OULED DJELLAL, de la population caprine AMAZIGH ou KABYLE et enfin de la population bovine.

1.2- Prélèvement et contrôle

Les échantillons de laits ont été aseptiquement prélevés. La traite est réalisée après lavage soigné des mains et aseptisation. La fréquence et les lieux de prélèvement sont indiqués dans le tableau 15. Le lait a été recueilli dans un flacon en verre de 250 ml stérile après avoir éliminé la première dizaine de jets, conservé à 4 °C et acheminé directement au laboratoire pour analyse. Les laits prélevés correspondent aux laits d'une seule traite, celle du matin. Les échantillons ont été soigneusement étiquetés (population, lieu, date de prélèvement, état physiologique de l'animal, période de traite, saison...).

1.3-Technique de prélèvement

Les échantillons de lait ont été aseptiquement prélevés. Pour ce faire, le pis et la mamelle de l'animale ont été nettoyés à l'eau savonneuse, rincées à l'eau distillée stérile et essuyés à l'aide d'une serviette de papier stérile.

La traite est réalisée après un lavage soigné et aseptisation des mains. Le lait a été recueilli dans des flacons stériles de 250 ml soigneusement étiquetés, après avoir éliminé les premiers jets, et immédiatement conservé à 4°C et analysés dans la journée. Les laits prélevés correspondent aux laits d'une seule traite, celle du matin. Les laits contaminés ou mammités ont été écartés. Seuls les laits sains sont retenus pour la recherche des lactocoques.

2- Souches de lactocoques

Les souches présumées lactocoques ont été isolées à partir des laits de vache, de chèvre et de brebis de différentes fermes du périmètre du moyen Chélif en différentes saisons de l'année (hiver, printemps et été) de l'année 2006. Elles ont été cultivées sur milieux sélectifs et conservées en vue d'être étudiées. Des souches industrielles fournies par l'ORLAC des ARRIBS (Arib, W-Ain Defla) sont utilisées comme souches de référence.

2.1 - Origine des souches

Les souches ont été isolées à partir des laits de vache, chèvre et brebis de différentes fermes du périmètre du moyen Chélif durant les saisons de l'hiver, printemps et été de l'année

2006. Le tableau 05 présente les principaux sites de prélèvement ainsi que le nombre d'échantillons de laits collectés.

2.2 - Choix des laits

Les laits sont choisis selon leur état sanitaire et hygiénique. Les prélèvements sont faits à partir d'animaux sains et ne présentant pas de signes de mammites. Les éventuelles mammites subcliniques au niveau des quartiers des trayons et/ou de mamelles sont détectées par le papier test mammite. Le virage du papier du jaune au bleu au contact du lait est un indice de mammite et l'échantillon est écarté. Le contrôle microbiologique au laboratoire concerne la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux et des staphylocoques à coagulase positif. Une numération cellulaire.

2.3 - Prélèvement et conditionnement

Les échantillons des laits sont collectés chacun dans des flacons stériles en verre de 250 ml de capacité et remplis à 220 ml juste à la sortie de la mamelle. Rapidement conditionnés à 4°C, et acheminés vers le laboratoire. Les laits sains sont la source d'isolements sélectifs des lactocoques et subissent parallèlement une caractérisation physicochimique et biochimique.

2.4 - Isolement et purification des lactocoques

Les souches présumées lactocoques ont été isolées à partir des laits de vache, de chèvre et de brebis de différentes fermes du périmètre du moyen Chélib en différentes saisons de l'année (hiver, printemps et été) de l'année 2006.

Elles ont été cultivées sur milieux sélectifs et conservées en vue d'être étudiées. Des souches industrielles fournies par l'ORLAC des ARRIBS (Arib, Wilaya de Ain Defla) sont utilisées comme souches de référence. Les techniques citées sont celles décrites par Guiraud (2003).

Techniques d'isolement :

L'isolement a été effectué à partir des échantillons le jour même de leur réception. Une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} dans l'eau physiologique stérile a été réalisée à partir de l'échantillon homogénéisé par agitation. Les trois dernières dilutions ont été ensemencées en masse dans la gélose M17 en boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées couvercles en bas à 30°C pendant 24 à 48 h.

Tableau 5 : Lieu, origine animale et nombre de prélèvement du lait cru.

	Lieu	Origine animale	Nombre de prélèvement
Périmètre du moyen Chélif	Oued Fodda	Vache + Brebis	4
	El-Karimia	Vache + Brebis	3
	Bir Saf-Saf	Vache + Brebis	4
	Oum Drou	Vache	3
	Ouled Abbas	Vache +Brebis + Chèvre	4
	Chlef centre	Vache	3
	Chettia	Vache +Chèvre	3
	Ouled farés	Vache +Chèvre+ Brebis	4
	Boukadir	Vache+ Chèvre+ Brebis	4
	Oued -Sly	Vache	4
	Medjadja	Vache +Chèvre+ Brebis	5

Techniques de purification :

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur les bouillons M17, MRS et Elliker jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode des stries. La pureté des souches est confirmée par prélèvement de colonies représentatives du genre lactococcus, par observation microscopique après coloration de Gram et le test de la catalase à chaque repiquage. Seules les bactéries Gram positif et catalase négative et de forme coccique sont retenues et conservées pour une identification ultérieure.

Conservation des souches

Les cultures pures sont stockées à +4 pour l'usage de routine dans les milieux gélosés M17, MRS et Elliker (en boîte de Pétri et en tube), à -20°C comme stock de deuxième utilisation et à -80°C comme stock stratégique. Dans ce cas le culot d'une culture de 24 heures (dans les différents bouillons en tube) est centrifugé à 6000 trs.mn/15mn/4°C le culot dans des tubes Eppendorf est additionné d'un bouillon de culture neuf glycérolé à la concentration de 15% v/v (autoclavé à 121°C/20mn).

3 - Identification des isolats

Une batterie de tests portant sur les caractéristiques culturelles, morphologiques et biochimiques sur les cultures pures a été conduite en vue de leur identification.

3.1- Etude des caractères cultureux et morphologiques

Les colonies des cultures pures sur milieu gélosé sont examinées selon leur caractéristiques relatives à leur taille, contour, forme, couleur, aspect (brillant, mat, muqueux)

ainsi que leur consistance. Cet examen peut être effectué à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire. Par examen microscopique en immersion d'un frottis on distingue la morphologie, la taille et l'arrangement des cellules. La coloration différentielle de Gram permet une distinction, selon la coloration finale des cellules, les Gram positifs (de coloration violette) sont retenus pour la suite des investigations.

3.2 - Etude des caractères physiologiques et biochimiques :

3.2.1 - Caractères physiologiques

Type respiratoire :

Le comportement vis à vis de l'oxygène a été étudié par ensemencement d'une gélose profonde VF (viande-foie) répartie en tubes en culot de 10 à 15cm. L'ensemencement est effectué par pique centrale à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'au fond du tube et que l'on remonte ensuite en décrivant une spirale de façon à répartir uniformément la suspension sur toute la hauteur du culot. Les tubes sont incubés 24 à 48 heures à 30°C.

Température de croissance :

La croissance à 10°C et à 45°C est déterminée en ensemençant des tubes de bouillons de cultures ou lait écrémé stérile. Les tubes incubés à 45 °C sont examinés après 24 à 48 heures, alors que ceux incubés à 10°C sont examinés après 7 à 10 jours. L'apparition d'un trouble est synonyme de croissance.

Croissance en conditions hostiles :

Halophilie

Pour étudier l'halophilie des lactocoques, on cultive les souches pures sur milieu hypertonique (bouillon additionné de NaCl à 2,4 et 6,5 %). L'incubation est réalisée durant une période de 24 à 48 heures à 30°C. La croissance est appréciée par l'apparition de troubles.

Croissance à pH 9,6 :

Le bouillon réparti en tubes et ajusté à pH 9,6 par ajout de NaOH 1N stérile est inoculé par des souches pures ensuite incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures. La mise en évidence de la croissance est traduite par le développement d'un trouble.

Croissance en présence de la bile :

La tolérance aux sels biliaries des lactocoques a été étudiée par ensemencement par une suspension jeune de souches isolées d'une série de tubes de bouillon M17 additionnés de 0,3 % de bile. Après 24 heures d'incubation à 30°C, la croissance de ces souches est appréciée par la détermination de la densité optique à 620 nm (Tanaka et al., 1999).

Thermorésistance :

Les bouillons en tubes sont inoculés par des cultures jeunes de souches pures puis chauffés à 60°C pendant 30 minutes. Après rapide refroidissement, ils sont incubés 24 à 48 heures à 30°C. Les souches mésophiles sont incapables de se développer dans ces conditions.

Croissance sur lait bleu de Sherman :

L'activité réductasique du bleu de méthylène est une caractéristique des espèces lactiques mésophiles. Du lait écrémé stérile à 1 % (p/v) de bleu de méthylène estensemencé et incubé 24 à 48 heures à 30°C. Le test est positif s'il y a décoloration du lait.

Tolérance au tellurite :

La tolérance au tellurite est recherchée par ensemencement du milieu gélosé contenant 0,4 % de tellurite de potassium. Les cocci résistants donnent des colonies noires ; ceux qui poussent mal donnent de petites colonies grises après une période d'incubation de 24 à 48 heures à 30°C.

3.2.2 - Caractères biochimiques

Mise en évidence des enzymes de respiration catalase et oxydase :

La présence de la catalase consiste à déposer une goutte d'H₂O₂, dilué au 1/dixième, sur une lame de verre et à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie jeune est prélevée ensuite délayée dans la goutte. Un dégagement gazeux (O₂) indique la présence de la catalase. La présence d'oxydase est mise en évidence par la technique de Kovacs. Un disque « OX » est placé sur une lame et imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile puis un fragment d'une colonie jeune est déposé à la surface. Une coloration rose apparaît en quelques minutes signe d'une réaction positive.

Culture sur lait tournesolé :

Ce test a pour objectif de mettre en évidence la présence de la réductase. Un ensemencement à 1 % dans un lait écrémé à partir d'une culture jeune sur bouillon. L'activité au cours de culture à 30°C est notée. Le tournesol est un indicateur du potentiel d'oxydoréduction et de pH. Un virage du mauve au rose indique une acidification (A) due à l'attaque du lactose, une décoloration de l'indicateur depuis le fond du tube traduit une réduction (R), la souche peut ensuite coaguler le lait (C). Les lactocoques réduisent le tournesol avant de coaguler le lait.

Activité hémolytique :

Le caractère hémolytique est étudié par culture sur gélose au sang. Une base gélosée est fondue, ramenée à 45°C, additionnée de 5 % de sang défibriné de cheval et coulée en boîtes de

pétri. Le milieu estensemencé par les souches isolées par stries, après incubation et culture, l'aspect de la gélose autour des colonies est examiné :

- Zone verdâtre : hémolyse α
- Auréole claire : hémolyse β
- Pas de modification : pas d'hémolyse ou hémolyse γ

Recherche de la citratase :

Elle est mise en évidence par culture sur gélose semi-solide au lait écrémé citraté. La gélose estensemencée dans la masse et incubée à 30°C pendant 2 à 7 jours. La fermentation se traduit par la production de gaz. Cette enzyme n'est présente que chez *Lactococcus lactis subsp lactis* biovar *diacetylactis*. Elle conduit à la formation d'acétoïne.

Hydrolyse de l'amidon:

Elle est testée par une culture sur milieu gélosé additionné de 0,3 % d'amidon soluble de pomme de terre en boîtes de Pétri. Après incubation 24 à 72 heures à 30°C, l'hydrolyse est caractérisée par pulvérisation d'une solution iodo-iodurée à la surface de la boîte. Les zones claires autour des colonies traduisent une activité amylolytique.

3.2.3 - Caractérisation du métabolisme carboné

Recherche du type fermentaire :

Le test de Gibson et Abd El Malek permet d'apprécier le type de métabolisme par lequel le substrat carboné est utilisé. Il est homofermentaire si l'acide lactique est le seul produit formé et hétérofermentaire si d'autres composés sont aussi présents tel que l'acide acétique, l'éthanol et le CO₂. Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 à 48 heures.

Fermentation des sucres

L'eau peptonée en tubes contenant du pourpre de Bromocrésol BCP comme indicateur de pH sont additionnés de sucres à la concentration finale de 0,5% sontensemencés par une culture jeune. Après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, le développement de la culture se traduit par le virage de l'indicateur coloré dû à l'acidification. Les sucres suivants sont testés : maltose, tréhalose, Mélibiose, raffinose, inuline, sorbitol, arabinose, mannitol, lactose, xylose, Inositol, cellobiose, rhamnose, ribose et galactose.

3.2.4 - Etude du métabolisme azoté

L'activité de l'arginine dihydrolase (ADH) est mise en évidence par la méthode classique sur bouillon de Moeller en tube. Chaque tube estensemencé par 3 ou 4 gouttes d'une suspension dense d'une culture jeune. Après incubation 24 à 48 heures à 30°C, l'activité enzymatique se traduit par le virage de l'indicateur par alcalinisation du milieu.

4 - Caractérisation technologique des souches

4.1 - Comportement vis à vis des substances protéiques

Production d'amines biogènes

La décarboxylation de l'histidine est étudiée selon la méthode décrite par Joosten (1989). Elle consisté à comparer le pH de 02 échantillons : l'un contenant la souche à tester, incubé à 30°C en présence de L-Histidine, l'autre ne contenant que la souche préparée dans les mêmes conditions. Si le pH de la première est supérieur à celui de l'autre, on peut penser qu'il y a décarboxylation de l'histidine, l'histamine étant plus basique.

Hydrolyse de la gélatine

Un milieu à la gélatine est préparé (gélatine nutritive), réparti en culot etensemencé dans la masse. Après refroidissement, les tubes sont incubés à l'étuve. Ensuite mis au réfrigérateur ; la persistance d'une liquéfaction à 4 °C traduit la protéolyse

Hydrolyse de la caséine :

Cette recherche est réalisée sur lait tournesolé. On peut observer après ensemencement et incubation à 30 °C :

- Acidification du milieu avec souvent coagulation (lactose+)
- Alcalinisation simple (attaque de la caséine)

Alcalinisation et peptonisation (éclaircissement progressif du milieu débutant vers la surface)

- Réduction du colorant au fond du tube.

4.2- Etude du pouvoir acidifiant

L'activité acidifiante est mesurée par titrage acide-base en présence de Phénolphtaléine à 1 %. L'acidité lactique générée est exprimée en degrés Dornic (°D) qui correspond à 0,1 ml de soude de 0,1 N. soit à un 0,1 g d'acide lactique/ L de lait. (Bradly et al., 1992).

4.3 – Etude de la croissance

L'évolution de la biomasse en fonction du temps a été déterminée par la mesure de la densité optique à 600 nm, les cellules viables et cultivables par dénombrement sur gélose M17.

4.4 - Mesure du diacétyle

Un volume de lait est inoculé par une suspension jeune d'une souche productrice de diacétyle. La culture est incubée à 21°C dans une enceinte thermostatée. A intervalle de temps régulier 1 ml de culture est prélevé, déféqué au CARREZ ensuite filtré cette aliquote est mélangé à 0,4 ml d'α- naphтол à 0,5 % dans 4,6 ml d'eau distillée, homogénéisé et mise à l'abri de la lumière pendant au moins 20 minutes. L'intensité de la coloration développée est mesurée à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu double canaux) et comparée à celle obtenue par

une courbe étalon établie dans les mêmes conditions par utilisation du diacétyle pure (de 0 à 3 ppm de concentration) (King, 1948).

5 - Classement des souches par outil statistique

L'approche statistique en vue de classer les souches est basée sur la vitesse d'acidification. Le pouvoir acidifiant de ces souches est étudié en utilisant quelques paramètres dérivés des courbes d'acidification. Les données sont traitées par une méthode appelée l'analyse en composantes principales A.C.P. Le logiciel SPAD utilisé pour le traitement statistique des données, permettra de mettre en évidence une grande diversité et une répartition de souches en groupes et la comparaison entre elles.

5.1 - Principe de l'ACP

L'analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode statistique essentiellement descriptive ; son objectif est de présenter, sous une forme graphique, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données (Diday et *al.*, 1982 ; Philippeau, 1992). Ce tableau doit être constitué, en ligne par des individus (n) et en colonne par des variables quantitatives (p) sur lesquels sont mesurées des variables quantitatives (Dervin, 1992). L'ACP permet de savoir :

- Comment se structurent les variables (convergentes ou divergentes)
- Comment se répartissent les individus ; quels sont ceux qui se ressemblent quels sont ceux qui sont dissemblables. Ce tableau définit alors deux espaces :
 - l'espace des individus ou chacun d'eux (i) est représenté par un point de coordonnées $(A_{i1}, A_{i2}, \dots, A_{ip})$.
 - l'espace des variables ou chacune d'elles (j) est représentée par le point de coordonnées $(A_{1j}, A_{2j}, \dots, A_{nj})$.
- de visualiser les observations dans un espace à deux ou trois dimensions.

Pour faciliter la visualisation des individus, l'ACP réduit les dimensions de cet espace à une dimension (axe principal) ou à deux dimensions (plan à deux axes). Les axes issus de cette réduction ne sont pas réalisés avec les variables initiales mais avec des indices synthétiques obtenus par combinaison linéaire des variables initiales. Ces axes sont appelés composantes principales ou axes principaux. Les individus sont alors représentés dans un espace à p dimensions. Parmi tous les indices possibles, L'ACP recherche d'abord celui qui permet de « voir au mieux » les individus, c'est à dire celui pour lequel « la variance des individus est maximale » ; cet indice est appelé « première composante principale » ou « premier axe principal ». Une certaine proportion de la variation est expliquée par cette composante principale. Une deuxième composante principale est recherchée à condition qu'elle soit non

corrélée avec la première et qu'elle soit à son tour la plus grande variance (Dervin, 1992). Cette deuxième composante principale ou «deuxième axe principal» fournit la plus grande information possible complémentaire de la première. Le processus se poursuit jusqu'à l'obtention de la dernière composante principale, la part d'information expliquée par chacune d'elles devenant de plus en plus faibles. Pour mieux observer les individus, il ne reste plus qu'à construire le plan à partir de deux composantes principales qui sont des variances maximales sous contrainte de non corrélation entre elles. La méthode de l'ACP repose sur la diagonalisation de l'une des deux matrices :

- Matrices des corrélations (on utilise des données centrées réduites lorsque les tableaux seront constitués de variables de différentes natures ou caractérisées par des unités différentes, c'est le cas le plus général). dans ce travail nous allons utiliser les données centrées réduites (normées) afin de donner le même poids aux différentes variables.
- Matrices des variances – covariances (on utilise les données centrées lorsque toutes les variables seront exprimées dans les mêmes unités, sans oublier que ce sont les variables les plus dispersées qui auront le plus de poids).

6 - Etude du potentiel probiotique

6.1 - Tolérance à l'acidité

L'aptitude des cultures pures à résister à l'acidité gastrique a été déterminée selon la technique décrite par Hydrominus et *al.* (2000). Après croissance sur bouillon M17 pendant 24 heures, le culot cellulaire est récupéré après centrifugation à 10 000 tours minute à 4°C. Ensuite réparti dans trois tubes contenant chacun 10 ml de bouillon M17 et ajustés respectivement à pH de 2,5 contenant 1 ml de pepsine (Sigma Aldrich) (0,3g/l en solution saline), simulant les conditions stomacal, à pH 4,5 (duodénum) et enfin à 6,5 (intestin). La charge cellulaire initiale est de l'ordre de 10^7 cfu/ml. Les temps d'incubation sont dans l'ordre 1 heure et demie (estomac), 2heures et demie (Duodénum) et 3 heures (intestin) à la température de 37 °C. La lecture de la densité optique à 660 nm permet de mesurer les variations dans la charge cellulaire lors de l'incubation à pH de 2,5 des dénombrements sur M17 gélosé à 37°C sont effectués pour les pH respectifs de 4,4 et 6.5 (Dilmibouras et Sadoun, 2002).

6.2 - Tolérance aux sels biliaires

La résistance à la bile est également déterminée par la méthode décrite par Hydrominus et *al.* (2000). Les suspensions cellulaires préparée comme précédemment sont incubées en présence

de 0,3% de bile à pH de 6,5. Les cellules viables sont déterminées après croissance sur gélose M17 à 37°C.

6.3 - Assimilation du Cholestérol

20µl du bouillon M17 (3% d'inoculum) est mis en contact avec 2ml de cholestérol pure le mélange est incubé à 37°C pendant 144h. La densité optique a été mesurée à des intervalles de temps différents (24h, 48h, 72h, 144h) à une longueur d'onde de 500 nm. La concentration initiale en cholestérol (considérée comme témoin) est mesurée en utilisant 20µl étalon de cholestérol (RE : biosystème S.A 11728) (annexe3) et 2ml de réactif (tableau 6). Le cholestérol libre ainsi que le cholestérol estérifié présent dans l'échantillon, donnent selon les réactions couplées décrites ci-dessous, un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie. (Biosystems S.A, RE : 11506) (Kimoto et al., 2002)

6.4 - Assimilation du triglycéride total

20 µl de l'échantillon et 2 ml de réactif sont déposés dans une cuve après incubation à 37°C, et de la même manière, une autre cuve a été préparée pour l'étalon (triglycéride résiduel) contient 2 ml de réactif et 20 µl d'étalon de triglycéride (RE : 11729) dont la densité optique est utilisée comme un témoin. Enfin les cuves d'étalon et du dosage ont été déposées dans le spectrophotomètre, la densité optique a été lue à la longueur d'onde de 500 nm. Les triglycérides présents dans l'échantillon donnent, selon les réactions décrites ci-dessous, un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie (Biosystems S.A, RE : 11528)

6.5 - Dégradation du lactose

La capacité d'hydrolyser le lactose est mesurée par la méthode enzymatique au colorimètre. Le lactose résiduel est quantitativement déterminé par utilisation du kit EnzyChrom™ Lactose BioAssay (ELAC-100). L'enzyme est une lactase qui hydrolyse le lactose et libère le galactose sous forme coloré. L'intensité de la couleur proportionnelle à la concentration du lactose dans la prise d'essai de 20µl est quantifiée au spectrophotomètre à 570 nm. Une culture pure de la souche est inoculée sur lait stérile sans matière grasse à raison de 10⁷cfu/ml, incubation à 37°C durant 144heures.

6.6 - Adhésion et colonisation

6.6.1 - L'hydrophobicité

l'hydrophobicité des cellules était déterminé en fonction de la capacité des souches sélectionnés à s'adhérer au KNO₃ (Ouweland et al., 1999) .avant de réaliser ce test, chaque ferment a été préparé par culture sur bouillon M17 . Le culot bactérien des cultures jeunes a été récupéré après centrifugation à 13000 rpm / 4min les cellules ont été lavées deux fois avec PBS et la densité optique à 450 nanomètre ajusté sur 0,5 0,01, 1ml de suspension bactérienne été

mélangée avec 60 µl de KNO₃ puis le mélange est agité par vortex pourcentage de l'hydrophobicité a été calculé selon la formule Savage (1992).

$$\% \text{ hydrophobicité} = (A_1 \text{ après} / A_0 \text{ avant}) \times 100$$

A₁ ET A₀ : valeur d'absorbance de la phase aqueuse avant et après le contact avec le KNO₃.

6.6.2 - Adhésion microbienne aux solvants (MATS)

L'adhésion aux solvants a été mesurée selon la méthode originellement proposée par Rosenberg et *al.*, (1980) et modifiée par Bellon-Fontaine et *al.*, (1996). Trois solvants sont testés sur la souche Lc C' et LcL₉ : l'Hexadecane, apolaire ; le chloroforme, monopolaire et un solvant acide l'acétate d'éthyle, monopolaire (Geertsema et *al.*, 1993). La lyse éventuelle des cellules en présence du solvant a été vérifiée avant son usage et aucune délétion n'a été observée.

6.6.3 - L'autoaggregation

Le test d'autoaggregation est effectué selon Del Re et *al.* (2000). Les bactéries sont cultivées 18h à 37°C en milieu M17 liquide les cellules sont centrifugées 5000 tours/minute pendant 15 min, lavées deux fois par une solution saline tamponnées d'environ 10⁸ ufc ml⁻¹. 4ml de suspension cellulaires ont été mélangés au vortex pendant 10 secondes et l'auto-agrégation est déterminée pendant cinq heures par mesure spectrophotométrique de la DO₆₀₀

6.6.4 - La coaggregation

Cette technique permet d'évaluer la capacité de bio élimination de pathogènes présumés en condition intestinale. La souche cible testé est *E. coli* CIP 35218. Deux volumes égaux (2 ml) de culture jeunes sur bouillons appropriés sont mélangés au vortex pendant 10 secondes par mesure spectrophotométrique de la DO₆₀₀

6.7 - Comportement vis-à-vis d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des souches locales isolées de *Lactococcus lactis* vis à vis de certains antibiotiques les plus prescrits dans les soins vétérinaires, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide. Des disques imprégnés de l'antibiotique à tester, sont déposés sur la surface de la gélose M17ensemencée de souches isolées dont veut étudier la sensibilité. L'antibiotique contenu dans le disque diffuse dans le milieu et y détermine des concentrations inversement proportionnelles à la distance du disque. Il s'agit donc de mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque après 24 heures d'incubation. Les antibiotiques étudiés sont : la pénicilline, oxacilline, ampicilline et l'érythromycine et la vancomycine.

6.8 - Détermination de l'activité anti radicalaire (test au DPPH)

Cette activité a été mesurée sur le surnageant des cultures sur bouillon Elliker de 24 heures pour chaque souche. Pour évaluer l'activité antioxydant d'un composant, il faut que celui-ci réagisse avec un radical stable, 2,2-Diphényl-picrylhydrazyl (DPPH) solubilisé dans l'éthanol absolu. La réduction du DPPH est suivie par un contrôle de la diminution de l'absorbance. Sous sa forme radicalaire, le DPPH absorbe à 517 nm mais la réaction avec un antioxydant (AH) ou une espèce radicalaire (R°) fait disparaître cette absorption.



L'activité anti radicalaire est mesurée selon la méthode décrite par Bersuder et *al.* (1998). Différentes concentrations de peptides ont été préparées à partir d'une solution mère de 20 mg/ml de chaque surnageant. 500µl de la solution peptidique sont mélangés avec 500µl d'éthanol 99.5% et 125 µl d'éthanol contenant 0.02% de DPPH, le mélange est incubé à l'obscurité et après 60 min l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est calculée comme suit :

$$\text{Pouvoir d'inhibition de DPPH (\%)} = \frac{C+B-E}{C} * 100$$

C : absorbance du contrôle, 500 µl eau distillée + 500 µl éthanol (99.5%) + 125 µl DPPH (0.02%) ; B : absorbance du blanc, 500 µl solution surnageant + 500 µl éthanol (99.5%) + 125 µl éthanol (99.5%) ; E : absorbance de l'échantillon, 500 µl solution surnageant + 500 µl éthanol (99.5%) + 125 µl DPPH (0.02%).

6.9 - Détection de l'activité antimicrobienne

La culture d'une nuit sur bouillon Elliker de la souche test pour la production de la bactériocine est centrifugée (10 minutes à 10000 rpm, 4°C). Le surnageant est filtré sur filtre d'acétate de cellulose (0.2µm) afin d'éliminer les cellules résiduelles. La culture d'une nuit (37°C) sur bouillon LB de la souche cible diluée dans la gélose Muller Hinton stérile en surfusion (au environ de 50°C) (2ml dans 50 ml correspondant à 10⁶ CFU/mL-1), rapidement étalée sur boîtes de Pétri est laissée se solidifier à 4°C. Des puits de 7 mm de diamètre sont réalisés dans la gélose MH et 20 µl du surnageant de la culture sont introduits dans chaque puit. Les boîtes ainsi préparées sont laissées une heure sur paillasse et deux heures à 4°C afin de faciliter la diffusion du surnageant sans croissance notable de la souche cible. Les boîtes sont étuvées à 37°C pendant 24 heures. Les résultats sont observés par l'apparition ou non de zones d'inhibition.

Les souches cibles testées sont :

- *Listeria innocua* ATCC 51742
- *Micrococcus luteus*
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Enterococcus faecalis* CIP 29212
- *Salmonella typhimurium* CIP 5858,
- *Staphylococcus aureus* CIP 29213,
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.
- *Escherichia coli* CIP 35218
- *Bacillus cereus* CIP 6624
- *Candida albicans* ATCC 10231

6.9.1 - Sensibilité de la bactériocine aux enzymes, pH et aux traitements thermiques

L'étude de la nature biochimique de l'agent antimicrobien a été réalisée sur le surnageant brute, concentré et purifié. Tous les échantillons sont incubés une heure à 37°C avant le test anti listeria. Le pH du surnageant est ajusté à 6.5 par NaOH (1N) ensuite traité à la catalase (Sigma ; 500IU mL^{-1}). Soumis également à des traitements thermiques (de 60 à 120°C) et à différents pH (2 à 14). Les enzymes utilisées sont α -amylase (Sigma ; 1mg mL^{-1} 100 mM tampon phosphate, pH 6.9), α -chymotrypsine (Sigma, 1mg mL^{-1} , 0.05M tampon Tris- HCl (pH 8.0) -0.01M CaCl₂), La Pronase E (Sigma; 1mg mL^{-1} in 100mM tampon Tris-HCl , pH3), la protéinase K (Sigma; 1mg mL^{-1} in 100mM tampon Tris-HCl , pH 7.5), et la trypsine (Sigma, 1mg. mL^{-1} 50mM tampon Tris-HCl pH 8.0). Les tests anti listeria sont effectués comme décrit précédemment et 20 μ l de chaque préparation sont introduits dans chaque puit (dans le cas de la Pronase E la préparation est ajustée à pH de 6,5 avant la mise en puit). Les enzymes sont inactivées pendant trois minutes à 100°C. Des préparations témoins (solutions enzymatiques seules, tampon seules bactériocine plus tampon (brute, concentré et purifiée) et solutions brute, concentrée ou purifiée sont réalisées en parallèle dans les mêmes conditions) (cherif et *al.*, 2008 ; Lyon et Glatz, 1991).

6.9.2 - Cinétique de croissance et de production de la bactériocine

Les expériences de croissance ont été conduites dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de bouillon de culture (Elliker, jus de dattes, lactosérum, et enfin leur mélange) (pH 6.5) à 30°C sans agitation. Une pré culture d'une nuit de la souche productrice est effectuée sur milieu approprié afin d'inoculer le milieu correspondant à la densité cellulaire initiale de 10³ CFU mL^{-1} . A différents intervalles de temps, des prélèvements sont effectués, La densité optique à

600 nm, le dénombrement de la charge viable et cultivable (CFU mL⁻¹), le pH extracellulaire et la production de la bactériocine sont déterminés. La concentration de la bactériocine est mesurée sur chaque prise d'essai, par la méthode de dilutions critiques (Mayr et *al.*, 1972). La concentration exprimée en unité arbitraire par ml de la bactériocine (AUmL⁻¹) est calculée comme étant l'inverse de la plus grande dilution induisant une inhibition de *listeria innocua* ATCC 51742. Toutes les expériences sont répétées trois fois.

6.9.3- Extraction de la Bactériocine

L'extraction a été réalisé à partir du surnageant de culture de 24 heures de *Lactococcus lactis subsp cremoris* C' obtenu après centrifugation Durant 20 minutes à 10000 rpm à 4°C).

6.9.4- Précipitation au sulphate ammonium

La bactériocine a été concentrée par précipitation au sulphate d'ammonium comme décrit par Nieto-Lozano et *al.*, (1992). 400 g/l sont ajoutées au surnageant de la culture d'une nuit sur bouillon Elliker avec agitation magnétique à 4°C Le précipité est récupéré par centrifugation a 10 000 rpm/ 4°C pendant 10 minutes ensuite dissout dans le tampon phosphate 20 mM (pH 6)

6.9.4 -Extraction au chloroforme

Cette extraction est effectuée selon les recommandations de Burianek et Yousef (Burianek et Yousef, 2000). 100 ml de surnageant de la culture d'une nuit sont énergiquement agités Durant 20 minutes en présence de chloroforme (v/v) ensuite transférés dans une ampoule à décanté, à l'interface entre la phase aqueuse et organique contenant des vésicules de bactériocine sont récupérées. Le chloroforme résiduel est éliminé par le speed vacuum (50 heures, Unique, Martinsried, Germany). L'activité de la bactériocine est recherchée dans l'interface et la phase aqueuse.

6.9.5- Extraction par adsorption - désorption

Cette technique consiste à extraire la bactériocine adsorbée aux cellules productrices. La souche Lcc C'est mise à croitre sur milieu Elliker comme décrit plus haut. Le milieu de culture est chauffé à 70°C pendant 25 minutes (pour inactiver les cellules et les protéases) ensuite après refroidissement ajusté à pH 6,5. Les cellules sont collectées après centrifugation a 10 000 rpm /4°C pendant 15 minutes.

Le culot cellulaire est lavé au tampon de phosphate de sodium 5 mM (pH 6.5) centrifugé puis lavé une deuxième fois avec le même tampon (Le volume utilisé est le 1/5 du volume de culture). Les cellules ainsi lavées sont suspendues dans 50 ml d'une solution de NaCl 1 M a pH 2.5 après (ajustée à l'aide de 5% d'acide phosphorique) ensuite agitées pendant une heure à 4°C (dans la glace) à l'aide d'un agitateur magnétique).

La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 10 000 rpm /4°C/20 mn. La suspension cellulaire est resuspendue dans une solution tampon phosphate de sodium à pH de 6,5 et le résiduel en bactériocine est déterminé. Sur le surnageant la matière sèche, la teneur en protéines et le titre en bactériocine sont déterminés. Ce processus est répété deux fois dans le cas de la bactériocine. (Yang et al. (1994) ; Yang et Ray (1994).

6.9.6- Purification HPLC des extraits

Le système de chromatographie liquide haute pression en phase inverse (Waters 600E avec contrôle automatique du gradient et module de pompe Waters Wisp 717 à échantillonnage automatique et détecteur à photodiode Array Waters 996) sont utilisés pour l'acquisition des données chromatographiques.

Tout le processus chromatographique est effectué sur une colonne C18 Uptisphere (150mm×4.6mm, UP5ODB615QS, Interchim, Montluçon, France). Les données spectrales et chromatographiques sont stockées sur ordinateur NEC image. La phase mobile suivante au débit de 1mL/min⁻¹ est utilisée

A : Eau/ acide trifluoroacétique (1000 : 1, v/v)

B : l'Acétonitrile/acide trifluoroacétique (1000: 1, v/v)

Les échantillons avant d'être injectés sont filtrés à travers des filtres de 0.22µm. Le gradient suivant est appliqué 0–50% (v/v) A jusqu'à 80 minutes ensuite 50%–100% (v/v) B plus de 5 minutes. Un balayage en ligne de l'absorbance UV est utilisé entre 200 et 300 nm raison de un spectre par seconde avec une résolution de 1,2 nm. Les analyses chromatographique sont gérées par le logiciel Millennium (Zhao et al., 1997).

7 -Technique d'immobilisation

30g/l de support (pouzzolane) sont immergées dans 100 ml de milieu de culture dans un Erlenmeyer de 250 ml ensuite inoculés à 1% à l'aide d'une préculture développée sur le même milieu (agité à 80 rpm 24 heures à 30°C) de *Lactococcus lactis* (OD₆₀₀ = 0.5 approximativement 10⁸CFU/ml. Avant le processus d'immobilisation la pouzzolane est incinérée au four à 405°C pendant 24 heures ensuite rincée à l'eau distillée, séchée à 105°C jusqu'à poids constant. La détermination de la biomasse adsorbée à la pouzzolane est mesurée par la différence de la pesée avant et après incinération et lavage comme décrit précédemment.

8 -Conduite de la Fermentation

L'inoculum est constitué de 10 ml de milieu de culture (jus de datte ou lactosérum)ensemencé par 0,1 ml d'une culture fraîche de 12 heures de *Lactococcus lactis* incubée à 30°C 1 ml de cette culture est additionnée à 100 ml de milieu neuf ensuite incubé à 30°C pendant 18 heures. Cette pré culture est utilisée pour la fermentation en batch et en mode continu. La

fermentation à cellule libres ou immobilisée est conduite dans une série de colonnes en verre à double paroi de 200 ml de volume total contenant 100 ml de milieu de culture. En condition de d'immobilisation 30% (p/v) de pouzzolane sont ajoutées aux colonnes avant la stérilisation. La taille granulométrique étudiée est respectivement 1,25, 4 et 6,25 mm.

Le milieu est homogénéisé par agitation magnétique à 80 rpm. Les particules pouzzolaniques sont supportées par une grille en acier inoxydable à 2cm de la base de la colonne séparant le barreau magnétique d'agitation. Des prises de 3 ml sont prélevées à intervalles de temps régulier durant 192 heures de fermentation.

Le dispositif utilisé dans le cas de la fermentation en mode continu en vue de la production d'acide lactique (système ouvert avec flacon collecteur) ou en mode batch recyclé dans le cas de la production de la bactériocine (système fermé sans flacon collecteur) est illustré dans la figure X. Un flacon de deux litres contenant 1,5 litre de milieu de culture stérile légèrement agité est aspiré vers la colonne (diamètre intérieur de 5 cm et 15 cm de hauteur) par une pompe péristaltique. La température est maintenue à 30°C entre les parois de la colonne par circulation d'eau à l'aide d'un bain marie.

Au début le support dans le bioréacteur est immergé dans le milieu (à pH6.5) contenant une culture d'une nuit de souche *lactococcus lactis* à 1% (V/V) (10^8 cfu/ml) sans agitation. Après 24h le liquide est éliminé et le support est lave à l'eau distillée stérile jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit égale à celle de l'eau ensuite un milieu neuf est introduit dans le bioréacteur. La fermentation continue a été conduite à six temps de séjours correspondant aux taux de dilution de : 0,21- 0,26 - 0,31- 0,36 - 0,41- 0,46.

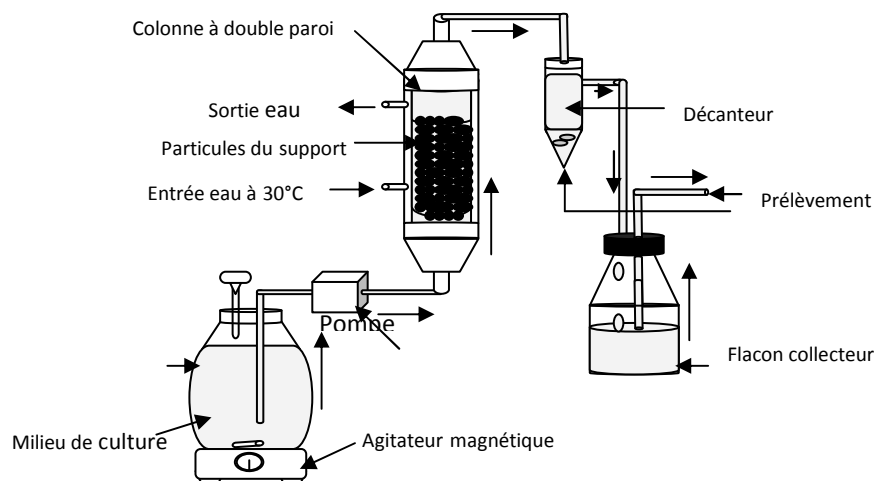


Figure 5 : Dispositif du bioréacteur de fermentation en continu.

9-Milieus de Culture

9.1 -Les milieux synthétiques

Les milieux synthétiques (M17, MRS et Elliker) sont des milieux en poudre et délayés selon besoin dans l'eau et stérilisés à 121°C/20minutes dans des flacons en verre

9.2 -Les milieux naturels

9.2.1 -Le lait

Dans les différentes expériences du lait écrémé stérile du commerce a été utilisé.

9.2.2 -Le Jus de datte

La méthode d'Al-Farsi (2002) a été utilisé avec certaines modifications .Les dattes (de la variété Ghars) ont été obtenus à partir de marché de Biskra dans le sud de l'Algérie. Après avoir nettoyé et dénoyautés manuellement, la pâte obtenue a été mélangée avec de l'eau désionisée dans un rapport 1: 1 (p / v), chauffé à 80 ° C pendant 90 minutes avec agitation continue. Le jus a été filtré sur filtre de mousseline, le résidu de la pulpe a été ensuite mélangée avec de l'eau comme précédemment et subi une deuxième extraction. L'opération a été répétée trois fois jusqu'à ce qu'aucune trace de sucre n'a été détectée dans l'extrait aqueux. Le jus extrait est ensuite soumis à une clarification enzymatique par des pectinases et des cellulases pendant une heure sous agitation à 50°C afin de solubiliser les fibres. Les surnageants après centrifugation à 11000 rpm / 10 mn, sont stérilisés par microfiltration sur 0,2 µm filtre Millipore et conservé à - 20°C jusqu'à utilisation.

9.2.3 - Le lactosérum

100 g de poudre de lactosérum sont délayés dans un litre d'eau distillée /l après ajustement du pH a 4.5 à l'aide d'HCl 5N ensuite chauffé à 121°C pendant 15min dans le but de dénaturer qui précipitent qui sont éliminée par centrifugation à 10 000 rpm/mn pendant 15 min. Le surnageant est ajusté a pH 6.5 à l'aide de NaOH 1N, stérilisé à 121°C /15 min. EGhaly et *al.* (2003). Dans le cas de la production de l'acide lactique il est supplémenté en extrait de levures (5 g/l) en Mg SO₄.5H₂O (3g/L). (Ces concentrations sont obtenues après des travaux d'optimisation non décrites dans ce document).

10 - Méthodes d'analyses

10.1 -Détermination de la teneur en eau

La teneur en matière sèche est déterminée par la dessiccation d'une prise d'essai à une température voisine de 103°C dans une étuve à la pression atmosphérique jusqu'à masse pratiquement constante (Lecoq, 1965).

$$\%MS= Y/X.10$$

X : Poids de l'échantillon humide ;

Y : Poids de l'échantillon après dessiccation

10.2 -Détermination de la teneur en cendres

Son principe consiste à l'incinération d'une prise d'essai à $550 \pm 15^\circ\text{C}$ dans un four à moufle, jusqu'à l'obtention d'un résidu blanchâtre de poids constant. Dans le cas des jus, on ajoute quelques gouttes d'huile végétale pour éviter la formation de mousse, et on maintient la température à 200°C pendant 1 à 2h puis on passe à $500 \pm 15^\circ\text{C}$ durant 5 à 6h.

$$\%TC = \frac{M2 - M0}{M1 - M0} * 100$$

M0 : poids de la capsule vide ;

M1 : poids de la capsule et le poids de l'échantillon avant incinération ;

M2 : poids de la capsule et le poids de l'échantillon après incinération.

10.3 -Détermination de la densité

Le principe c'est de peser à l'aide d'une éprouvette de volume connu un volume de l'échantillon par rapport à la masse du même volume d'eau distillée.

$$D = \frac{m}{m^*}$$

m : masse du volume de l'échantillon m^* : masse du même volume en eau.

10.4 -Détermination de l'acidité titrable

Le dosage de l'acide lactique a été effectué par la détermination du l'acidité Dornic. 1°D correspond à 0.1g d'acide lactique par litre d'échantillon. Le principe consiste à neutraliser l'acide par une base NaOH (N/9) en présence de la phénolphtaléine à 1% comme indicateur de couleur.

10.5 -Evaluation de la biomasse par densité optique

La biomasse est évaluée par spectrophotométrie ou la mesure de la lumière absorbée par une suspension bactérienne à 600 nm est proportionnelle au nombre de cellules (Carip, 2008).

La relation n'est valable que pour des troubles de faible importance, au-delà de 0.8 nm les dilutions sont nécessaires puis la valeur obtenue est multipliée par le facteur de la dilution.

10.6 - Evaluation de la biomasse par numération sur milieu gélosé

Les numérations ont lieu par étalement de dilutions de fermentation sur boîte de pétri dans lesquelles est coulé du milieu Elliker gélosé. Les prélèvements de milieu de fermentation sont dilués en cascade dans l'eau physiologique stérile. Pour chaque dilution, 0.1 ml de suspension est déposé et étalé sur la surface de la gélose. Trois étalements sont réalisés pour chaque dilution. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 48h après lesquels un comptage est

effectué. Cette méthode offre un avantage considérable ; elle permet de mesurer le nombre de bactéries viables (Tortora et *al.*, 2003).

10.7 -Dosage des sucres

Le principe est basé sur le dosage de tous les glucides après leurs hydrolyses en sucres réducteurs. Les sucres réducteurs sont dosés par une méthode colorimétrique avec le réactif l'acide 3,5-Dinitrosalicylique (DNS). Pour réaliser le dosage, on effectue dans un tube à essai le mélange de 1ml de réactif DNSA dont la préparation est annexée (annexe 04) avec 1ml d'échantillon à analyser. Après homogénéisation du mélange, on porte le tout à 100°C pendant 10 min. A la sortie du bain marie, le refroidissement dans un bain à glace et l'ajout de 20ml d'eau distillée arrête la réaction (Akin, 2008). La lecture de l'absorbance à 530 nm permet de déterminer, à partir de la gamme étalon et en tenant compte des dilutions.

10.8 -Dosage des protéines

La méthode de Bradford (1976) a été utilisée pour doser les protéines. Elle est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 (0,060 g, acide perchlorique 3 g, chlorure de sodium, 2,92 g dans 100 ml d'eau distillée) sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (arg, his, et lys) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes). Elle permet de doser des quantités de protéine de l'ordre du microgramme. L'extrait protéique a été dilué dans le réactif de Bradford selon le rapport (1:1, v/v). Après le mélange, l'intensité de la coloration a été déterminée au spectrophotomètre à 595 nm. La sérum albumine bovine a été utilisé pour établir la droite d'étalonnage dans les mêmes conditions. L'acide lactique, l'acétoïne, l'acétate, le glucose, le galactose et le fructose ont été dosé par HPLC couplée à un détecteur UV à 210 nm. Une colonne d'exclusion ionique Aminex HPX-87H est éluée à l'aide d'une solution de 5 mM d'acide sulfurique à 0.6 ml/min, maintenue à la température de 35 °C (Zhao et *al.*, 1997).

11-Mesures physiques

La minéralogie de la pouzzolane, support d'immobilisation de souches de lactococcus, a été effectuée par diffraction aux rayons X. Les données de la diffraction sont fournis par le diffractomètre de marque Philips PW3710 de géométrie Bragg- Brentano en utilisant des filtres en Nickel pour les radiations alpha de Cu et K. Le voltage utilisé est de 30KV avec un ampérage de 20mA et un angle de balayage du scan allant de 0 à 60° chaque intervalle du scan couvre 0,02°. L'imagerie électronique de la surface de la pouzzolane a été déterminée par un microscope électronique d'imagerie de surface SEM-FED model (JEOL-JSM-6301F). Le voltage d'accélération a été réglé à 7KV et la distance de travail à 15mm.

Porosité

Un milieu poreux est un matériau constitué des particules solides cimentées entre elles et formant un squelette autour du quels subsistent des espaces vides. L'autre phase qui est fluide, occupe le volume poreux constitué par les espaces vides de la phase solide. La porosité (degré de vide) c'est la fraction volumique occupée par le fluide entre les grains (Menoret, 2001).

$$\frac{\text{Volume d'eau nécessaire à la saturation}}{\text{Volume du matériau saturé}} \quad \Phi : \text{Porosité totale du matériau.}$$

$\Phi =$

Densité et masse volumique

La masse volumique apparente d'un matériau est mesurée en effectuant le rapport masse sèche sur volume. Cette mesure prend en compte dans l'estimation du volume, les vides ménagés par la porosité du matériau. La masse volumique s'exprime en Kg.m^{-3} . L'augmentation de volume et de masse provoquée par l'introduction du matériau dans une éprouvette d'eau permet d'estimer sa masse volumique réelle, c'est à dire le rapport entre masse de matériau sec et le volume qu'il occupe sans prise en compte des vides. La densité s'obtient en faisant le rapport entre la masse volumique réelle du matériau et celle de l'eau (Menoret, 2001).

$$\rho_{\text{matériau}} = \frac{\Delta m_{\text{matériau}}}{\Delta v_{\text{matériau}}}$$

$\rho_{\text{matériau}}$: Masse volumique du matériau (Kg.m^{-3}).

$$d = \frac{\rho_{\text{matériau}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

d : Densité du matériau, le cas de pouzzolane la densité est égale à 1,02 (Menoret, 2001).

Aire spécifique

L'aire spécifique A_s d'un matériau correspond à la surface totale des particules par unité de volume. L'hypothèse de la sphéricité des particules est couramment admise pour estimer A_s . Le cas de pouzzolane, la surface spécifique est estimée à $> 5900 \text{ cm}^2 / \text{g}$ (Menoret, 2001).

Le pH

Le potentiel hydrogène a été déterminé par méthode électrochimique après étalonnage de l'électrode à l'aide de solution tampon appropriées et compensation de la température. Le model Hanna instrument a été utilisé. Les valeurs trouvées sont exprimées en unité pH.

La conductivité électrique

Mesuré par voie électrochimique à l'aide d'un appareil de type Hanna. Les valeurs trouvées sont exprimées en micro siemens par centimètre carré.

12 - Analyses Statistiques

Toutes les expériences ont été effectuées en double avec un plan en blocs aléatoires complets, et les données ont été analysées par analyse de la variance (ANOVA) avec détermination de la plus petite différence significative (ppds) à $p < 0,05$.

-Aperçu sur le bassin laitier du moyen Cheliff

La région de plaine de moyen Cheliff qui peut être qualifiée de bassin laitier est représentative de la problématique nationale où l'on enregistre un taux moyen de près de 50% de couverture des besoins en lait par la production annuelle du lait cru (Belhadia *et al.*, 2014) Cette plaine se positionne au nord du bassin du Chélif (nord-ouest de l'Algérie) à environ 150 km à l'ouest d'Alger et à 35 km à vol d'oiseau de la méditerranée.

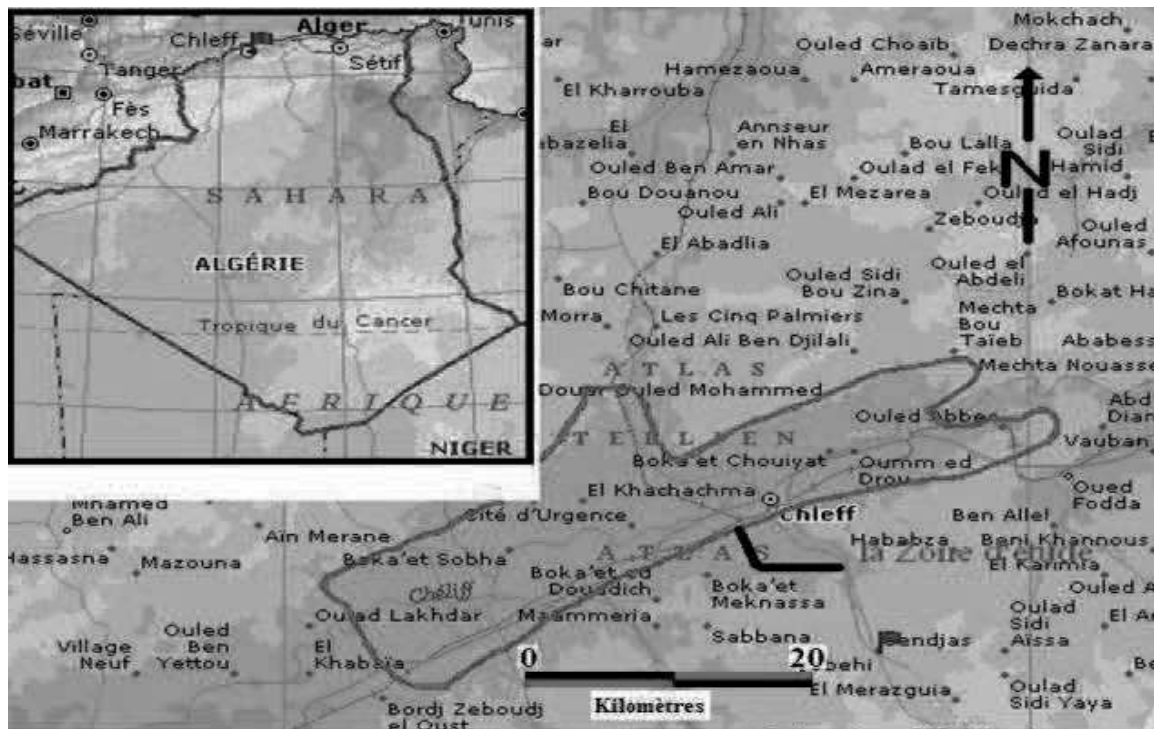


Figure 6 : Localisation de la zone d'étude (source Atlas mondial, année 2005)

La zone d'étude couvre la vallée du Cheliff, depuis 11 Km de l'amont d'Oum Drou, jusqu'à 10 km en aval de Boukadir. Elle s'étend dans la partie centrale jusqu'à Ouled Fares dans la vallée de l'affluent dit Oued Ouahrane. Ce secteur est limité au Nord par les monts de Medjadja (flanc sud du Dahra) d'altitude moyenne de 600 met au Sud par le massif de L'Ouarsenis d'altitude moyenne de 1200 m. Ce bassin laitier s'étend sur les communes d'Ouled Abbes, Oum Drou, L'abiodh Medjadja, Chlef, Chettia, Ouled Fares, Sobha, Oued fodda, Oued Sly et Boukadir. Trois étages bioclimatiques caractérisent le bassin sur le plan morphologique ; les collines de Medjadja de 400 à 500 m d'altitude, les montagnes rouges et leur prolongement oriental de 160 à 200m, les plateaux situés au sud est et au sud-ouest du chef-lieu de 200 à 350 m de hauteur, La plaine forme une étroite bande dans sa partie orientale d'une dizaine de kilomètres de largeur qui draine le Cheliff. Le climat du périmètre est rude et contrasté par des étés chauds et des températures basses en hiver, avec des précipitations moyennes annuelles de l'ordre de 250 mm Les études pédologiques effectuées dans cette région et citées par Douaoui et

al. (2004) montrent que les sols de la plaine sont globalement formés de sols peu évolués caractérisés par une teneur en limon élevée et une structure faiblement développée surtout en profondeur sur le plan physico chimique se sont des sols calcimagnésiques plus argileux avec accumulation de calcaire en profondeur. L'agriculture est la principale activité elle constitue 45% du revenu du périmètre dont la composante principale est l'arboriculture secondée par le maraichage puis la céréaliculture.

2- Caractéristiques des laits de vaches, de chèvres et de brebis et élaboration du souchier

Au total deux cent échantillons de laits ont été collectés à partir de différentes origines animales dont cent (100) échantillons d'origine bovine, cinquante (50) caprine et cinquante (50) ovine. Une caractérisation physicochimique et biochimique globale a été réalisée et les résultats trouvés sont consignés respectivement dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 6 : Caractéristiques physico chimiques des laits de prélèvements (Saison printanière valeurs moyennes de deux années successives 2005/2006)

Paramètre	Vache	Chèvre	Brebis
Densité _{15°C} g/l	1,033 ± 0,044	1,032 ± ,012	1,034 ± 0,05
CE _{20°C} μS /cm	600 ± 54	560 ± 2	40 ± 10
pH _{20°C}	6,6 ± 0,4	6,5 ± 0,2	6,7 ± 0,25

Tableau 7 : Caractéristiques biochimiques des laits de prélèvements (Saison printanière valeurs moyennes de deux années successives 2005/2006).

Paramètre g/l	Vaches	chèvres	Brebis
Extrait sec total	138,5 ± 1,2	134 ± 0,5	183 ± 1,2
Matière grasse	50 ± 2	41 ± 3	65 ± 2
Lactose	48,02 ± 2,5	45 ± 2,6	51 ± 1,4
Protéines	34,59 ± 0,4	34 ± 0,6	57 ± 1,2
Chlorures	1,49 ± 0,75	1,11 ± 0,5	3,12 ± 0,5
Cendres	7,1 ± 0,2	8,4 ± 0,3	9,5 ± 0,4

Les laits retenus pour l'isolation microbiologique des espèces appartenant au genre *Lactococcus* sont sur le plan physico-chimique et biochimique des laits normaux. Toute modification à ce niveau serait signe de pathologie. La mesure des variations du potentiel électrique (ou de la conductivité) du lait des premiers jets peut révéler d'éventuelles mammites. Selon Biggadike et *al.* (2002) la conductivité électrique dans les premiers jets serait directement proportionnelle à la gravité de l'infection du pis. D'après Norberg et *al.* (2004) la conductivité du lait d'un quartier sain est en général comprise entre 400 et 550μS/cm à 25°C. Cependant de nombreux facteurs de variation existent entre autre la « race » qui peut avoir une influence sur la

conductivité du lait (Jacquinet, 2009). Un taux de chlorures anormalement élevé peut être un signe très révélateur de mammites. Selon Bradley et Greent (2000) une composition normale d'un lait n'est pas une garantie suffisante d'absence de pathologie chez l'animal surtout dans le cas des mammites subcliniques. La réponse immunitaire de l'animale envers une invasion par un agent de mammites est l'envoi de leucocytes dans le lait pour neutraliser l'attaque du pathogène (Duval, 1995).

De plus la production d'acide lactique par les bactéries lactiques pendant la fermentation est responsable d'une réduction du pH du milieu de culture et d'une augmentation de sa conductivité électrique, due à l'accumulation des ions lactate (Latrille et *al.*, 1992). Selon ces auteurs, la mesure de la conductivité électrique du milieu permet, indirectement, d'estimer les concentrations cellulaires, en substrat et en produits. Carvalho et *al.* (2003) ont ainsi montré que le suivi de la conductivité électrique au cours de la fermentation est une méthode rapide et reproductible, qui permet de vérifier l'effet des conditions de production. Suite à cela nous avons entrepris une recherche de bioindicateurs associés à la présence de mammites particulièrement les staphylocoques a coagulase positive qui sont très fréquents et très persistants que ce soit dans le cas de mammites cliniques ou subcliniques ainsi que la numération des globules blancs (Cervinkova et *al.*, 2013).

Les laits de composition normale et n'abritant pas de staphylocoques a coagulase positive et dont la numération en globules blancs ne dépassant le niveau de $250 \cdot 10^3$ cellules leucocytaires ont été retenus pour l'isolation sélective des lactocoques. En final nous avons pu collecter vingt et une souches persistantes par culture sur milieu M17 appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* dans le bassin laitier du moyen Chélif et dont les tentatives d'identification montrent la distribution suivante :

- 14 isolats de souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* ; représentent 66,66 %
- 03 isolats de souches de *Lactococcus lactis subsp cremoris* ; représentent 14,30 %
- 04 isolats de souches de *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*. représentent 19,04 %

Les résultats trouvés révèlent que globalement les souches isolées de *Lactococcus lactis* représentent 66,66 % pour la sous espèce lactis, 14,30 % pour la sous espèce cremoris et 19,04 % pour la sous espèce lactis Diacetylactis. La distribution centésimale des sous espèces par type de lait est reportée dans la figure 7. Le profil de distribution des sous espèces par type de lait montre une dominance de la sous espèce lactis dans le lait de vache et de chèvre, par contre dans le lait de brebis la sous espèce cremoris semble être la plus présente.

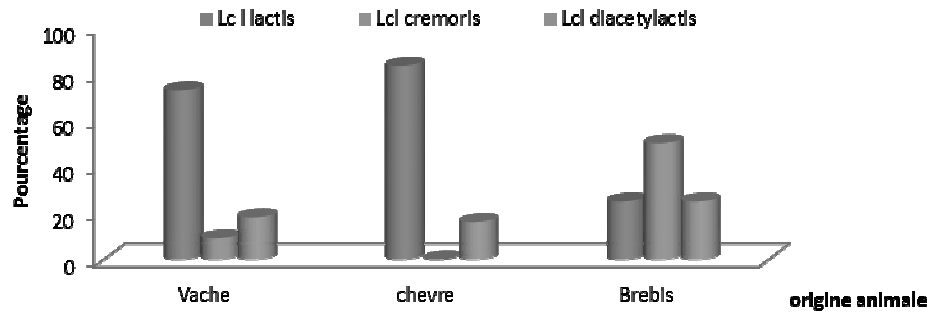


Figure 7 : Distribution annuelle moyenne en pourcent des sous espèces de *lactococcus lactis* dans le lait de vache, de brebis et de chèvre dans le bassin laitier du moyen Chellif.

3- Persistance saisonnière des souches de *Lactococcus lactis* dans les trois types de lait

La répartition moyenne par sous espèce dans les différents type de lait en fonction des saisons de prélèvement est représentée par les histogrammes des figures 9 et 10. Les taux de présence sont calculés par rapport au total de la microflore. Dans le tableau 7 sont mentionnés les sous espèces de *Lactococcus lactis* selon leur appartenance animale.

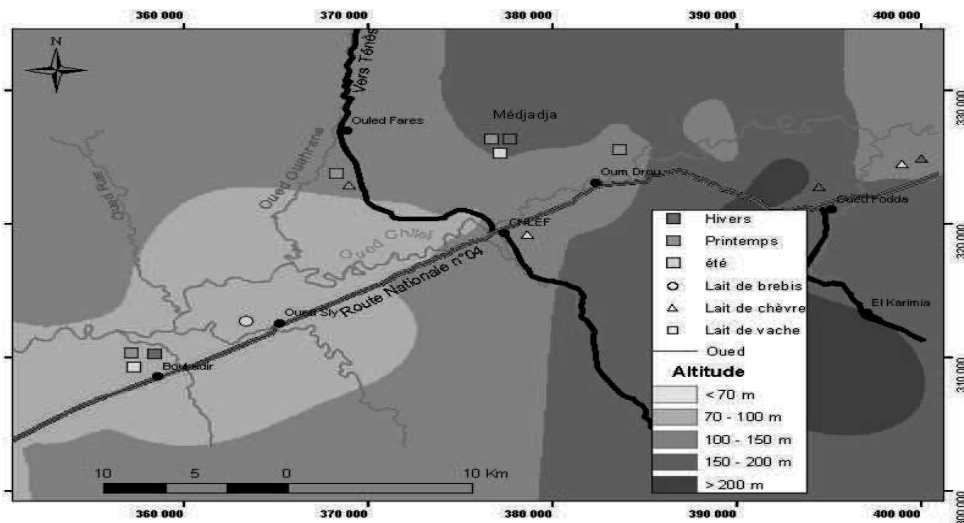


Figure 8 : Carte représentant les sites de prélèvements et de persistance de sous espèces de *lactococcus lactis* selon l'appartenance animale.

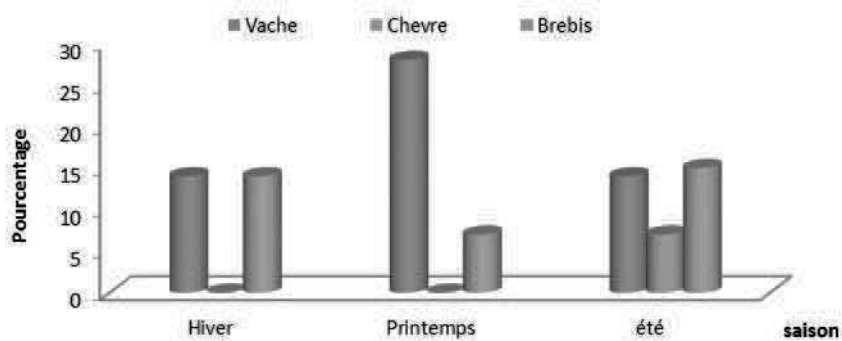


Figure 9 : Prévalence de la sous espèces *Lactococcus lactis subsp lactis* en fonction des saisons et de l'origine animale dans le bassin laitier du moyen Chellif.

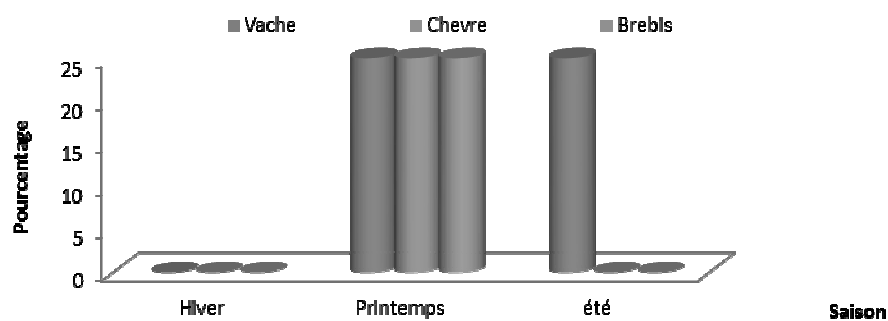


Figure 10 : Prévalence de la sous espèce *Lactococcus lactis subsp cremoris* en fonction des saisons et de l'origine animale dans le bassin laitier du moyen Chellif.

Le profil de distribution des sous espèces par type de lait montre une :

- Dominance de la sous espèce lactis dans le lait de vache et de chèvre.
- Dominance de la sous espèce cremoris dans le lait de Brebis.
- Absence de la sous espèce cremoris dans le lait de chèvre.

4- Caractéristiques phénotypiques des isolats

Sur le plan morpho-culturelle et microscopique toutes les colonies prélevées à partir du milieu M17 sont rondes ou lenticulaires, à contour régulier, d'un blanc opaque. Les cellules sont sous forme de coques isolées, en paires ou en chaînettes à Gram + et catalase négatif, non motiles et asporulées, anaérobies facultatives.

Toutes sont capables de croître à 10 et 30°C et à 2% et 6% de NaCl faiblement à 45°C et pas à pH 9,6. Selon Petranxiene et Lapied (1981), ces souches peuvent être des lactocoques. Les critères utilisés pour déterminer l'espèce et la sous espèce et les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 9, 10, 11, 12, 13 et 14. Les souches des isolats ont été identifiées en se basant sur leurs caractéristiques physiologiques et biochimiques données par Dellaglio et *al.* (1994) ; Stiles et Holzapfel (1997), Schleifer et *al.* (1985) et Guiraud (1998). Le caractère homofermentaire du glucose est confirmé par l'absence de production de CO₂ et exclusivement de l'isomère L+ lactate. A ce stade les isolats ont été confondus avec les espèces du genre *Enterococcus* habituellement décrites dans la littérature.

Tableau 8 : Répartition saisonnière des souches de lactococcus selon l'origine animale

Origine du lait	Espèce	Code	Saison d'apparition
Vache	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 1	Lcc ₁	Hiver
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 1	Lcd ₁	Printemps
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 4	Lcd ₄	Hiver
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 1	Lcl ₁	Hiver
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 2	Lcl ₂	Hiver
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 7	Lcl ₇	Printemps
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 10	Lcl ₁₀	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 11	Lcl ₁₁	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 5	Lcl ₅	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 6	Lcl ₆	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 8	Lcl ₈	Été
Chèvre	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 3	Lcl ₁₃	Hiver
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 4	Lcl ₄	Printemps
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 9	Lcl ₉	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 12	Lcl ₁₂	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 13	Lcl ₁₃	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 2	Lcd ₂	Printemps
Brebis	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 2	Lclc ₂	Hiver
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacétylactis</i> 3	Lcd ₃	Printemps
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 14	Lcl ₁₄	Été
	<i>Lc lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> C'	lcC'	Été

L'utilisation des galeries API 50CHL (Bio Mérieux) nous a permis la confirmation de leur appartenance au genre *lactococcus*. Ces caractères de résistance à 6% de NaCl, et de capacité de cultiver en présence de 40% de sels biliaires, d'hydrolyse de l'esculine et de croitre à 45°C (faiblement) font la particularité de ces souches et déterminent leur atypicité.

Ce phénomène a été également décrit par Karam et Karam (2006) dans leurs travaux sur la microflore des laits de chèvres du sud algérien. Ces auteurs expliquent ce comportement par l'adaptation physiologique de ces souches à un environnement riche en NaCl. Le bassin laitier du moyen Chellif, comme il a été décrit précédemment est un écosystème de climat aride et de sols plus ou moins fortement salinisés, la biocénose subit ces contraintes et fini par s'adapter. Doui et al. (2009) rapportent également que certaines souches du genre *Lactococcus* isolées à partir du beurre de brebis présentaient les mêmes caractéristiques.

Ce comportement particulier d'halo-résistance et de thermotolérance peut présenter un intérêt technologique car elles pourraient en effet être testées dans l'élaboration de produits lactofermentés salés (fromages, viandes, végétaux, ...). Par ailleurs Schleifer (1998) signale que les sous espèces *lactis* et *diacetylactis* résistent à 40% de sels biliaires par contre ce comportement est variable chez la sous espèce *cremoris*. Les souches qui se cultivent sur lait bleu de Sherman (réductase +) et fermentent le maltose, possédant une arginase et produisent de l'acétoïne, possèdent une citratase sont présumés être des *Lactococcus lactis subsp Diacetylactis*.

Celles qui sont incapables de produire de l'acétoïne sont des *lactococcus lactis subsp lactis*. Les sous espèces de *lactococcus lactis subsp cremoris* par contre ne peuvent fermenter le maltose et ne produisent pas d'arginase. Habituellement, les lactocoques croissent dans 0,5 à 4% de NaCl, voire 6,5% de NaCl pour certaines espèces telle que *L. lactis subsp. lactis* (Hamasaki et al., 2003). Leur croissance est inhibée à des pH inférieurs à 4,4. La plupart des espèces sont mésophiles leur température optimale étant voisine de 30°C, mais elles se développent généralement à 10°C.

Tableau 9 : Caractéristiques des souches de *lactococcus lactis* originaires du lait de vaches.

Origine du lait	Lait de vache										
	Hivers			Printemps					Eté		
Saisons	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V4	V5	V1	V2	V3
Caractère/ Souches	V1	V2	V3	V1	V2	V3	V4	V5	V1	V2	V3
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ
Croissance à :											
10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 9,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire	μA	μA	μA	μA	μA	μA	μA	μA	μA	μA	μA
Type fermentaire	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
Croissance à :											
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6,5% de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sur milieu bilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Résistance 30 mn à 63°C	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance sur lait Sherman	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'arginine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Résistance au tellurite	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citratase	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Acétoïne	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Lait tournesolé	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
Hydrolyse esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espèce	LcL ₁	LcL ₂	LcC ₁	LcL ₅	LcL ₆	LcD ₁	LcL ₇	LcL ₈	LcL ₁₀	LcL ₁₁	LcD ₄

Tableau 10 : Profil de fermentation des sucres des isolats du lait de vaches.

Lait de vaches											
<i>Lactose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Galactose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Maltose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Mélibiose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sorbitol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Raffinose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Xylose</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Mannitol</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tréhalose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Cellobiose</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Inositol</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Espèce</i>	<i>Lc.L₁</i>	<i>Lc.L₂</i>	<i>Lc.L₅</i>	<i>Lc.L₆</i>	<i>Lc.L₇</i>	<i>Lc.L₈</i>	<i>Lc.L₁₀</i>	<i>Lc.L₁₁</i>	<i>Lc.C₁</i>	<i>Lc.D₁</i>	<i>Lc.D₄</i>

Tableau 11 : Caractéristiques des souches de *Lactococcus lactis* originaires du lait de chèvres.

Origine du lait	Lait de chèvre					
	Hivers		Printemps		Eté	
Caractère/ Souches	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>
<i>Gram</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Oxydase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Catalase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hémolyse</i>	γ	γ	γ	γ	γ	γ
<i>Croissance à :</i>						
10°C	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance à pH 9,6</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Type respiratoire</i>	μA	μA	μA	μA	μA	μA
<i>Type fermentaire</i>	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
<i>Croissance à :</i>						
2%	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+
6,5% de NaCl	+	+	+	+	+	+
<i>sur milieu bilité</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Résistance 30 mn à 63°C</i>	-	-	-	+	-	-
<i>lait de Sherman</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hydrolyse de l'arginine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Acétoïne</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Résistance au tellurite</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Gélatinase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citratase</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Lait tournesolé</i>	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
<i>Hydrolyse de l'amidon</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrolyse esculine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Espèce</i>	<i>LcL₃</i>	<i>LcL₄</i>	<i>LcD₂</i>	<i>LcL₉</i>	<i>LcL₁₂</i>	<i>LcL₁₃</i>

Tableau 12 : Profil de fermentation des sucres des isolats du lait de chèvres

Lait de chèvre						
<i>Lactose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Galactose</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Maltose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mélibiose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sorbitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Raffinose</i>	-	-	-	+	-	-
<i>Xylose</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Mannitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tréhalose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Cellobiose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Inositol</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Espèce</i>	<i>Lc.L₃</i>	<i>Lc.L₄</i>	<i>Lc.L₉</i>	<i>Lc.D₂</i>	<i>Lc.L₁₂</i>	<i>Lc.L₁₃</i>

Tableau 13 : Caractéristiques des souches de *lactococcus lactis* originaires du lait de brebis.

Origine du lait	Lait de brebis					
	Hivers	Printemps		Eté		
Saisons	<i>B1</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B1</i>	<i>SII</i>	<i>SI2</i>
<i>Caractère/ Souches</i>	<i>B1</i>	<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B1</i>	<i>SII</i>	<i>SI2</i>
<i>Gram</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Oxydase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Catalase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hémolyse</i>	γ	γ	γ	γ	γ	γ
<i>Croissance à :</i>						
<i>10°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>30°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>45°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance à pH 9,6</i>	-	-	-	-	+	+
<i>Type respiratoire</i>	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A	A-A
<i>Type fermentaire</i>	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho	Ho
<i>Croissance à :</i>						
<i>2%</i>	+	+	+	+	+	+
<i>4%</i>	+	+	+	+	+	+
<i>6,5% de NaCl</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Croissance sur milieu bilié</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Résistance 30 mn à 63°C</i>	-	-	-	+	-	-
<i>sur lait de Sherman</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Hydrolyse de l'arginine</i>	-	-	+	+	+	-
<i>Acétoine</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Résistance au tellurite</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Gélatinase</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citratase</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Lait tournesolé</i>	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC	ARC
<i>Hydrolyse de l'amidon</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hydrolyse esculine</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Espèce</i>	<i>Lc.C₂</i>	<i>Lc.C</i>	<i>Lc.D₃</i>	<i>Lc.L₁₄</i>	<i>Lc.L*</i>	<i>Lc.C*</i>

Tableau 14 : Profil de fermentation des sucres des souches des isolats du lait de brebis

Sucre	Lait de brebis				Souches de référence	
	<i>Lactose</i>	+	+	+	+	+
<i>Glucose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Galactose</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Maltose</i>	+	+	+	-	-	+
<i>Mélibiose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sorbitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Raffinose</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Xylose</i>	-	-	+	-	+	-
<i>Mannitol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Arabinose</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tréhalose</i>	-	-	+	+	+	-
<i>Cellobiose</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Inositol</i>	-	-	+	+	+	-
<i>Espèce</i>	<i>Lc.C₂</i>	<i>Lc.C₁</i>	<i>Lc.D₃</i>	<i>Lc.L₁₄</i>	<i>Lc.L*</i>	<i>Lc.C*</i>

+ : Réaction positive ; - : réaction négative ; **A** : acidification ; **R** : réduction ; **C** : coagulation ; **μA** : micro-aérobie ;

Ho : homofermentaire. **V** : isolat à partir du lait de vache. **B** : isolat à partir du lait de brebis. **C** : isolat à partir du lait de chèvre. **S1** et **S2** : bactéries lactiques présumées lactocoques isolées à partir de ferments lyophilisés.

5- Discussion

Le développement des connaissances sur la population microbienne du lait cru est d'un grand intérêt. Avant les travaux de Desmasures (1995) aucune étude ne mettait en relation la composition globale de la flore de laits crus (flore d'intérêt technologique et flore indésirable) avec l'ensemble de leurs conditions de productions, c'est-à-dire avec l'ensemble des pratiques des producteurs. Julien et *al.* (2008) montrent dans leur étude que les bactéries présentes dans les mamelles sont composées principalement de bactéries lactiques et leur nombre est limité par le système immunitaire de l'animal et les agents antimicrobiens sécrétés dans le lait. Le nombre et les types de microorganismes présents dans le lait sont influencés par la saison, la ferme, l'hygiène, l'alimentation. Le nombre de bactéries dans le lait varie de quelques centaines à plusieurs milliers par millilitre de lait fraîchement tiré des vaches saines (Michel et *al.*, 2001). Peu d'études ont été publiées sur ce sujet.

Une synthèse des données disponibles permet d'estimer ce niveau de la flore halotolérante à 10^3 unités ufc.ml⁻¹ de lait, la variabilité entre laits peut être très importante (Salama et *al.*, 1995). Si l'on s'intéresse à l'exemple des lactocoques, les valeurs extrêmes du pourcentage de lactocoques dans la flore « totale » semblent être comparables entre laits fortement chargés (1 à 50% de lactocoques pour 178 laits refroidis ou non contenant 10^5 à 10^8

ufc.ml⁻¹) et laits peu chargés (2 à 50% pour 69 laits réfrigérés de charge allant de 7.10^2 à $7,9.10^4$ ufc.ml⁻¹). Les valeurs moyennes publiées pour le pourcentage de lactocoques dans la flore « totale » varient d'environ 6 à 30% pour des laits fortement chargés, dans le cas de deux études portant sur des laits pauci-microbiens, elles sont de 7 à 13%. En valeur relative, le pourcentage des lactocoques dans la flore est donc au mieux équivalent voire plus faible dans les laits pauci-microbiens. Par ailleurs il faut signaler que les méthodes de culture dépendantes ne permettent que la mise en évidence d'espèces cultivables dominantes et sont particulièrement inadéquates pour les microorganismes viables et non cultivables (Klijn et al., 1995).

En Algérie peu d'études sur les bactéries lactiques ont été entreprises que soit celles d'origines bovine, caprine ou ovine c'est aussi l'avis de Karam (1995). le peu existant n'est que fragmentaire. Cependant nous citerons ceux de Sellami et al. (2007) sur la flore lactique endémique du lait caprin dans la région de la kabylie (populations kabyle et Arabia) montrent que les lactocoques viennent en seconde position après les lactobacilles et représentent une moyenne de 22,9% de la flore lactique totale résidente chez la population de kabyle. Ce taux est constant chez la population Arabia et varie dans l'intervalle de 31,02 à 32,64% avec une faible variabilité inter-espèces. La répartition des genres dans les deux populations caprines semble montrer que le genre *Lactobacillus* est nettement prédominant dans la population Kabyle (61.48 %); suivi de *Lactococcus* (22.9%). Les deux genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* sont représentés de façon presque similaire dans la race Arabia (32.64 % et 31.02 % respectivement). Les auteurs soulignent que les espèces *Lc subsp lactis*, *Lc subsp cremoris*, *diacetylactis* et *Lc plantarum* sont les composantes de la flore lactococcique de la race Arabia par contre les espèces *Lc. garviae*, *Lc. raffinolactis* *Lc hordeniae*, *Lc subsp cremoris* *Lcl subsp lactis* et *Lc plantarum* sont retrouvées dans les laits de la race Kabyle. Cheriguene et al. (2007) dans leurs travaux sur les bactéries lactiques caprines à l'ouest algérien trouvent que les lactocoques sont les plus dominants et représentent 38% des isolats lactiques dont 60% sont *Lactococcus lactis subsp lactis*. Dans leur étude sur la diversité et la densité des bactéries lactiques caprines des zones arides du sud algérien Guessas et Kihal (2004) trouvent que (76.16%) des isolats cocciques sont des lactocoques avec une dominance de *Lactococcus lactis subsp. Lactis*. Les résultats des travaux de Moulay et al. (2013) montrent que le lait cru caprin des hauts plateaux contient une grande variété de bactéries lactiques.

Les lactocoques sont présents au premier plan et sont constitués de deux sous espèces *lactis* et *cremoris*. Dans le lait cru de vache à l'est algérien dans ses travaux, Bekhouche (2006) trouve que les coques (diplocoques et en chaînette) constituent 80,3 % de l'effectif total des isolats dont le genre *Lactococcus* est représenté. De proches résultats ont été rapportés par Saidi

et *al.* (2002) sur la caractérisation de 206 isolats de bactéries lactiques à partir de lait cru de la population caprine des régions arides, où ils ont montré une nette dominance des lactocoques (76.16%), et de l'espèce *Lc. lactis subsp. Lactis* particulièrement. Cette diversité, en relation avec la composition du lait cru de chaque population de chèvre, peut-être dû à l'aridité de l'environnement où vivent ces animaux comme signalé par Jenness (1979) ; Rameuf et *al.* (1991) ; Picque et *al.*(1992) et enfin Gomes et Malcata (1998). La structure du microbiote lactique peut être une résultante de la composition chimique et biochimique du lait. Ainsi la répartition des souches et aussi leur aptitude à croître dans ces laits ne sont pas identiques (Desmazeaud, 1994). Les souches de *Lc. lactis subsp. lactis* sont dominantes dans le lait cru.

La présence d'une di/tripeptidase fixée à leur paroi leur permettent d'être non exigeantes sur le plan nutritionnel (Law, 1979 ; De Roissart, 1986 ; Sandine, 1988) d'où leur existence en plus grand nombre. Les souches de *Lc. lactis subsp. cremoris* en sont dépourvues et leur isolement est plus difficile, leur concentration y étant faible (Sandine, 1985). Exterkate et De Veer (1987) montrent que c'est la caséine β en association avec une faible concentration de caséine κ qui permet une croissance optimale de cette sous-espèce. Ceci explique sa présence dans le lait de brebis qui se distingue des deux autres laits (de vache et de chèvre) par une richesse supérieure en matières grasses, en caséines α_s , β et κ et en minéraux (calcium et phosphore) (Juillard et *al.*, 1995).

Aptitudes technologiques des isolats

6-1- Croissance et pouvoir acidifiant

6-1.1- La croissance

La présente étude (macro et micro-cinétique) comparative des comportements de sous espèces des souches de *Lactococcus lactis*, appuyée par une analyse statistique, a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des comportements acidifiants inter-souches. En absence de limitation nutritionnelle et a pH non contrôlé la croissance détermine la cinétique d'acidification, et les phénotypes nutritionnels peuvent être distingués. Le milieu M17 lactose est potentiellement approprié à cette expérience puisque le panel de mesures qu'il permet est plus important, cependant il est indispensable de vérifier que le comportement bactérien y est bien similaire à celui observé en milieu laitier. La mesure de la vitesse spécifique de croissance est un critère important dans l'appréciation des performances d'une souche microbienne. Ce paramètre est mesuré lors de la phase exponentielle de croissance tant que n'intervient pas un facteur limitant. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 15. Un taux de croissance de $0,43 \text{ h}^{-1}$ est atteint par la souche *Lc.L9* il est relativement supérieure à celui enregistré par la souche

de référence *Lc. L** ($0,40 \text{ h}^{-1}$). Les autres souches de *Lc. lactis subsp lactis* montrent des taux de croissance allant de $0,34$ à $0,38 \text{ h}^{-1}$. Les souches de *Lactococcus Lactis subsp cremoris* et *Lc. Lactis biovar diacetylactis* présentent des niveaux de croissance plus faibles (respectivement de $0,35 \text{ h}^{-1}$ et $0,33 \text{ h}^{-1}$).

Tableau 15 : Taux de croissance μ des souches appartenant à l'espèce *Lactococcus lactis* cultivées sur milieu M17 à 30°C .

Souches	$\mu \text{ h}^{-1}$	Souches	$\mu \text{ h}^{-1}$	Souches	$\mu \text{ h}^{-1}$
<i>Lc.L₁</i>	$0,38 \pm 0,20$	<i>Lc.L₉</i>	$0,43 \pm 0,14$	<i>Lc.C</i>	$0,33 \pm 0,12$
<i>Lc.L₂</i>	$0,38 \pm 0,10$	<i>Lc.L₁₀</i>	$0,38 \pm 0,14$	<i>Lc.C*</i>	$0,35 \pm 0,14$
<i>Lc.L₃</i>	$0,34 \pm 0,15$	<i>Lc.L₁₁</i>	$0,33 \pm 0,12$	<i>Lc.d1</i>	$0,30 \pm 0,12$
<i>Lc.L₄</i>	$0,37 \pm 0,17$	<i>Lc.L₁₂</i>	$0,34 \pm 0,17$	<i>Lcd2</i>	$0,28 \pm 0,14$
<i>Lc.L₅</i>	$0,36 \pm 0,12$	<i>Lc.L₁₃</i>	$0,35 \pm 0,13$	<i>Lcd3</i>	$0,27 \pm 0,15$
<i>Lc.L₆</i>	$0,35 \pm 0,14$	<i>Lc.L₁₄</i>	$0,34 \pm 0,13$	<i>Lcd4</i>	$0,28 \pm 0,10$
<i>Lc.L₇</i>	$0,38 \pm 0,13$	<i>Lc.C₁</i>	$0,35 \pm 0,15$		
<i>Lc.L₈</i>	$0,36 \pm 0,14$	<i>Lc.C₂</i>	$0,38 \pm 0,16$		

6.1.2 - Pouvoir acidifiant :

La détermination du pouvoir acidifiant de nos souches est suivie par la mesure du pH et de l'acidité Dornic en culture pure dans les intervalles de temps de 2, 4, 6, 8 et 24 h à 30°C . Les vitesses d'acidification mesurées pour chacune après 4, 8 et 24 h d'incubation à 30°C serviront à l'analyse statistique. Les résultats obtenus de l'évolution de l'abaissement de pH sont illustrées dans les figures respectives 11, 12, 13 et 14. Comparativement à la souche de référence qui atteint une acidité de 86°D après 24 h d'incubation, les souches *Lc. L₉* et *Lc. L₁₃* sont légèrement plus acidifiantes. Elles atteignent des valeurs d'acidité respectives de 89°D et 87°D correspondant aux valeurs de pH 4 et 4,10 respectivement avec des vitesses d'acidification différentes. Ceci n'exclut pas l'importance des valeurs d'acidité atteintes par le reste des isolats de *Lactococcus lactis subsp lactis* dont les valeurs d'acidité oscillent entre 69°D et 85°D . Par ailleurs les souches de *Lc. Lactis subsp cremoris* : *lc.C₁*, *Lc.C₂*, *Lc C* et *Lc.C** présentent des valeurs d'acidité de 57°D , 60°D , 58°D et 58°D respectivement. Tandis que les souches de *L.lactis subsp diacetylactis* sont faiblement acidifiantes et leurs valeurs d'acidité ne dépassent pas 44°D . Les souches de *Lc. lactis subsp. Lactis* sont plus acidifiantes que celles des sous espèces *Cremoris* et *Diacetylactis*.

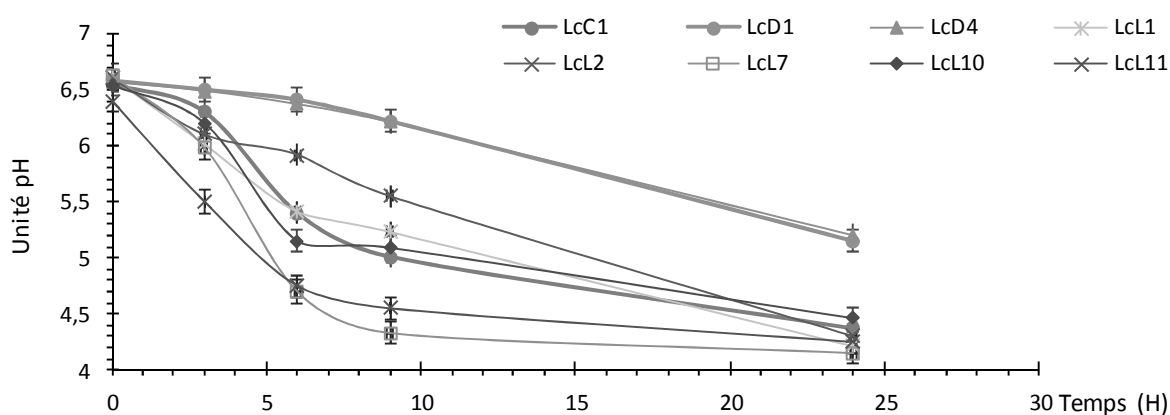


Figure 11 : Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine bovine *Lc.C1*, *Lc.D1*, *Lc.D4*, *Lc.L1*, *Lc.L2*, *Lc.L7*, *Lc.L10* et *Lc.L11*.

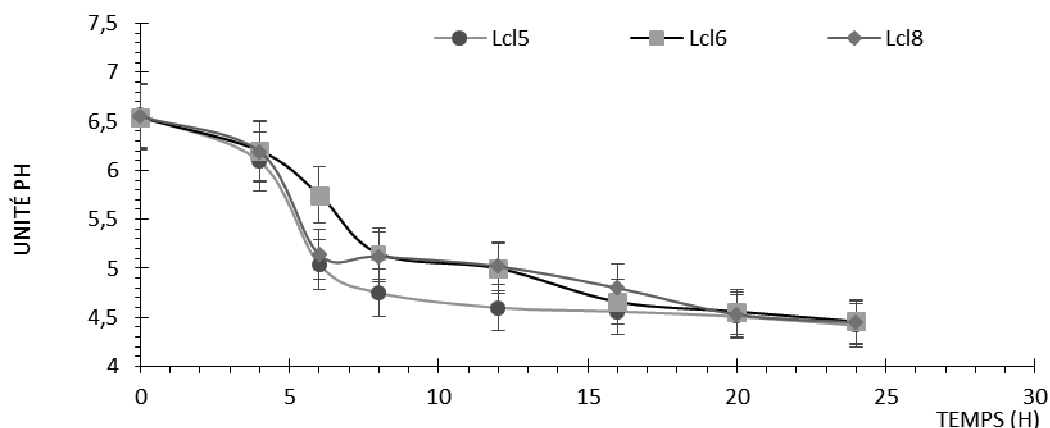


Figure 12 : Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine bovine *Lc.L5*, *Lc.L6*, *Lc.L8* (suite).

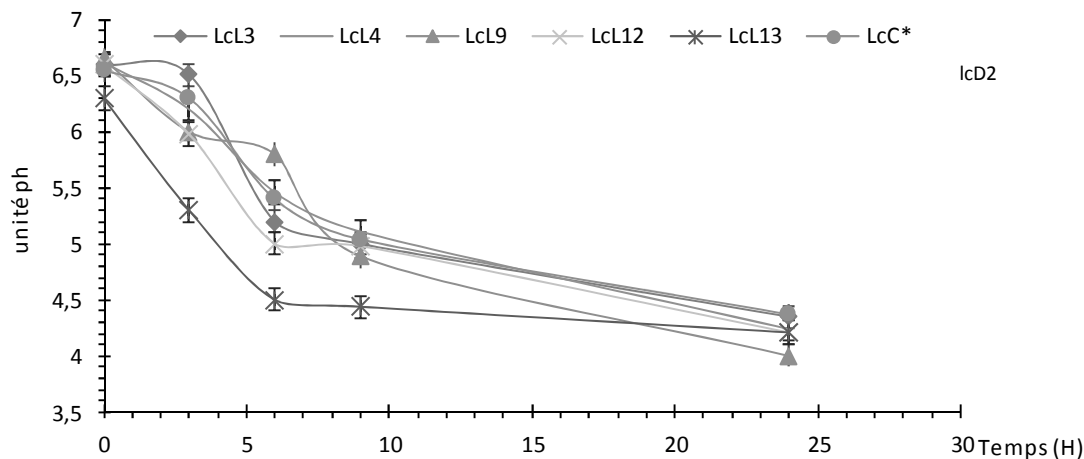


Figure 13 : Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine caprine *Lcl3*, *Lcl4*, *Lcl9*, *Lcl12*, *Lcl13*, *Lcd2*.

La production du lactate commence pendant la phase exponentielle et se poursuit durant la phase stationnaire. Ceci est confirmé par les travaux d'Eck (1987) où la quantité d'acide lactique produite par des souches industrielles de *Lactococcus lactis* à la fin de la phase exponentielle était de 0,37% et qui atteint 0,57 % pendant la phase stationnaire.

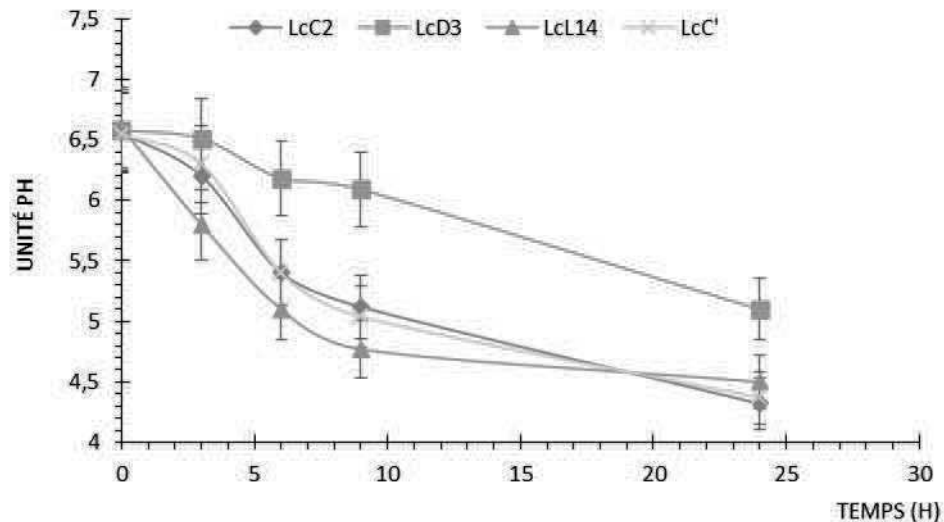


Figure14 : Evolution du pH à 30°C, en fonction du temps des cultures pures de souches d'origine ovine Lcc₂, Lcd₃, Lcl₁₄.

Le découplage entre la multiplication et la production d'acide semble lié à une sensibilité différente des réactions intervenant dans la croissance et dans la glycolyse vis à vis des conditions du milieu. En cours de fermentation, la multiplication des cellules est bloquée par l'acidité développée. Les lactocoques ont un pH optimal d'action de 6,5 et un pH minimal de 4,5 (De Roissart, 1986). Au-dessous de pH 4,5, l'activité et la stabilité de nombreuses enzymes est fortement réduite (Choisy et *al.*, 1987). Des pH plus inférieurs provoquent des dommages cellulaires (Novel,1993). Une acidification trop lente ou trop faible est également à l'origine des défauts de qualités de certains produits fermentés. Elles provoquent notamment pour les fromages un égouttage insuffisant, un risque de contamination par d'autres flores ou un excès de lactose avec risque de post-acidification, entraînant des conséquences sur les qualités technologiques, sanitaires et organoleptiques du produit fini. L'acidité du lait étant comprise entre 15 °D et 20 °D. Après 2h d'incubation, elle reste presque inchangée pour la totalité des souches. Ceci correspond à la phase de latence nécessaire à leur adaptation aux conditions de culture. Au-delà de cette phase, les souches présentent des niveaux d'acidité variables et c'est au cours de cette étape qu'on peut distinguer des différences entre les espèces et entre les souches de la même espèce. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Cogan (1980). La caractérisation des valeurs cardinales enregistrés durant l'acidification exprimés en unité pH et de temps sont enregistrés dans le tableau 17. L'analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée à l'aide du logiciel stat-Itcf. Cette technique de traitement des données, permettant de représenter visuellement les proximités entre les individus et entre les variables. Elle permet d'évaluer le comportement d'une variable par rapport aux autres variables et d'établir des corrélations entre elles.

6.1.3 - Analyse statistique

Dans une première étape, les variables représentant la plus grande variance sont groupées pour former le premier axe. Le deuxième axe représente la prochaine plus grande variance et ainsi de suite, jusqu'au moment où toute la variance des données est représentée. L'analyse des valeurs propres de chaque axe permet d'identifier le nombre d'axes nécessaires pour bien expliquer la variance des données étudiées. Une fois les axes d'études choisis, les variables sont positionnées dans un espace bidimensionnel, selon le comportement de leur variance par rapport aux axes en question. Lorsque des variables sont représentées par deux points proches, cela signifie qu'elles se comportent de façon similaire.

Dans une deuxième phase, les individus sont positionnés par rapport aux variables. Des individus caractérisés par des valeurs de coordonnées proches d'une variable sont caractérisés par un comportement similaire à la variable en question, et aussi entre eux. Pendant l'analyse des résultats d'une ACP, il est nécessaire de faire attention à la position des variables et des individus par rapport aux axes pour pouvoir bien expliquer les différences de comportements observés. Le classement des souches s'est fait en tenant compte de tous les caractères étudiés. La mesure du pH remplace de plus en plus celle de l'acidité titrable. En effet, elle est facile à exécuter et ne s'affecte que par un très faible coefficient de variation. Dans le cadre de notre travail, quatre différents descripteurs caractéristiques de l'activité acidifiante ont été calculés dans le but de caractériser le pouvoir acidifiant nécessaire à la comparaison des performances des souches étudiées (Pique et *al.*, 1992 ; Zarata et Basso, 1992). Les descripteurs calculés sont :

V_m : Vitesse maximale d'acidification

T_m : Temps où intervient V_m

pH_m : pH maximum

pH_f : pH final

Cette approche généralise la description du comportement d'acidification d'un large nombre de souches par l'application des techniques basées sur l'analyse statistique multivariée. De ce fait un quatrième descripteur est ajouté aux quatre précédant ; il s'agit de la vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance μ . Une analyse exploratrice des données obtenues est appliquée, elle est basée sur différentes représentations graphiques qui tiennent compte des paramètres estimées dans le tableau 16. Nous avons introduit cinq variables et avant d'entamer l'analyse des résultats, nous avons déterminé les liens entre ces variables par études des corrélations deux à deux (Tableau 17). Le degré de dispersion des variables (valeur propre ou variance) par rapport à leur point d'origine sur l'axe des composantes principales est déterminé. Ceci permet de définir pour chaque axe le pourcentage par rapport à la variance totale

Tableau 16 : Valeurs cardinales pour l'ensemble des isolats.

Paramètre	Souches	pH				4 h		8 h		24 h		V _m	pH _m	T _m	pH _f
		0 h	4 h	8 h	24 h	ΔpH	V	ΔpH	V	ΔpH	V				
Lc.L ₁	1	6,61	6,01	5,41	4,21	0,6	2,50	0,6	1,25	1,2	0,83	2,5	6,01	4	4,21
Lc.L ₂	2	6,6	6,1	5,92	4,3	0,5	2,08	0,18	0,37	1,62	1,12	2,08	6,1	4	4,3
Lc.L ₃	3	6,6	6,51	5,2	4,35	0,09	0,37	1,31	2,73	0,85	0,59	2,73	5,2	8	4,35
Lc.L ₄	4	6,62	6,2	5,46	4,24	0,42	1,75	0,74	1,54	1,22	0,84	1,75	6,2	4	4,24
Lc.L ₅	5	6,56	6,09	4,75	4,42	0,47	1,95	1,84	3,83	0,33	0,22	3,83	4,75	8	4,42
Lc.L ₆	6	6,54	6,2	5,15	4,46	0,34	1,41	1,05	2,18	0,69	0,47	2,18	5,15	8	4,46
Lc.L ₇	7	6,63	5,98	4,7	4,15	0,65	2,70	1,28	2,66	0,55	0,38	2,7	5,98	4	4,15
Lc.L ₈	8	6,55	6,19	5,12	4,45	0,36	1,50	1,07	2,23	0,67	0,46	2,23	5,12	8	4,45
Lc.L ₉	9	6,65	6	5,8	4	0,15	2,70	0,70	1,45	0,80	0,55	2,7	6	4	4
Lc.L ₁₀	10	6,54	6,2	5,15	4,46	0,34	1,41	1,05	2,18	0,69	0,47	2,18	5,15	8	4,46
Lc.L ₁₁	11	6,4	5,5	4,75	4,25	0,9	3,75	0,75	1,56	0,5	0,34	3,75	5,5	4	4,25
Lc.L ₁₂	12	6,6	5,98	5	4,21	0,62	2,58	0,98	2,04	0,79	0,54	2,58	5,98	4	4,21
Lc.L ₁₃	13	6,3	5,3	4,5	4,1	1,0	4,16	0,8	1,66	0,4	0,27	4,16	5,3	4	4,1
Lc.L*	14	6,6	6,02	5,4	4,2	0,58	2,41	1,2	2,5	2,4	1,66	2,5	5,4	8	4,2
Lc.C ₁	15	6,55	6,3	5,4	4,37	0,25	1,04	0,9	1,87	1,03	0,71	1,87	5,4	8	4,37
Lc.C ₂	16	6,56	6,2	5,4	4,32	0,36	1,50	0,80	1,66	1,08	0,75	1,66	5,4	8	4,32
Lc.C	17	6,5	6,23	5,64	4,35	0,27	1,12	0,59	1,23	1,29	0,89	1,23	5,64	8	4,35
Lc.C*	18	6,64	6,4	5,8	4,38	0,24	1,00	0,84	1,75	2,26	1,57	1,75	5,8	8	4,38
Lc.D ₁	19	6,58	6,5	6,41	5,15	0,08	0,33	0,09	0,18	1,26	0,87	0,87	5,15	24	5,15
Lc.D ₂	20	6,48	6,08	5,08	4,88	0,40	1,66	1,00	2,08	0,20	0,13	2,08	5,08	8	4,88
Lc.D ₃	21	6,58	6,51	6,18	5,1	0,07	0,29	0,33	0,68	1,08	0,75	0,75	5,1	24	5,1
Lc.D ₄	22	6,57	6,49	6,37	5,2	0,08	0,33	0,12	0,25	1,17	0,81	0,812	5,2	24	5,2
Lc.L ₁₄	23	6,6	5,8	5,1	4,5	0,80	3,33	0,70	1,45	0,60	0,41	3,33	5,8	4	4,5

V : Vitesse d'acidification (pH/ΔT). pH_m : pH maximum T_m : Temps ou intervient V_m
Lc.L : *Lactococcus lactis subsp lactis* **Lc.D** : *Lactococcus Lactis subsp lactis biovar diacetylactis* pH_f : pH final
V_m : Vitesse maximale d'acidification **Lc.C** : *Lactococcus lactis subsp cremoris* **Lc.L***, **lcc*** : ferment industriel

Tableau 17 : Corrélations entre les variables v_m, pH_m, pH_f, T_m et μ

Variables	V _m	pH _m	T _m	pH _f	μ
V _m	1				
pH _m	0,04	1			
T _m	- 0,69	- 0,52	1		
pH _f	- 0,63	- 0,54	0,90	1	
μ	0,35	0,46	- 0,54	- 0,67	1

Les axes 1 et 2 contribuent à représenter nos variables à 64,49 et 19,95 % respectivement. Ce pourcentage est beaucoup plus faible pour les axes 3, 4 et 5 (10,29, 3,74 et 1,53 respectivement). Les différentes composantes principales étant non corrélées entre elles. La part de l'information expliquée par deux axes du même plan est égale à une simple addition des parts des variances expliquées par chacun d'eux. Ainsi, le plan formé par les deux premiers axes explique 84,44 %, de la variance totale.

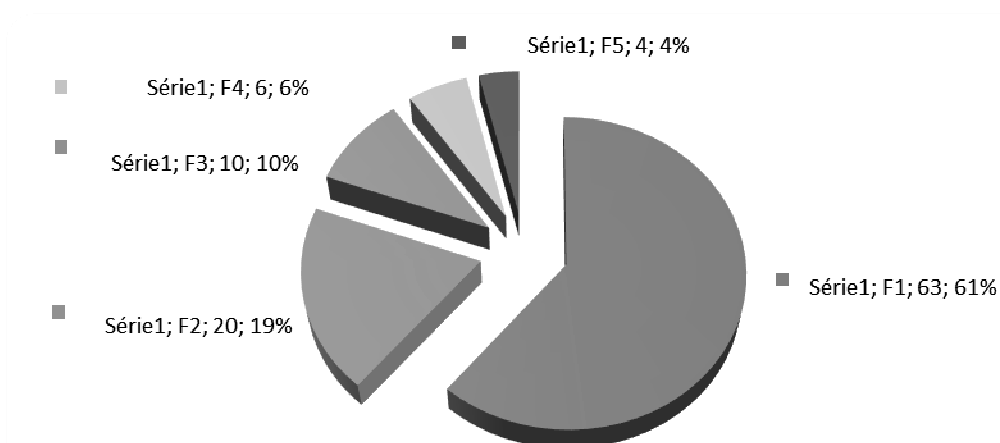


Figure 15 : Cercle de variabilité en fonction des facteurs.

L'information donnée par les trois premiers axes est de 94,73 %, à partir du quatrième axe, l'information obtenue devient assez faible pour être prise en compte. Les pourcentages de variation sont assez élevés pour les deux premiers axes avec un pourcentage cumulé de 84,44 %. Nous allons donc nous limiter à ces deux axes, où les variables sont mieux représentées (Tableau 19) pour nos interprétations.

6.1.4 - Etude des variables

La contribution de chaque variable dans la formation d'une composante principale est donnée par le coefficient de corrélation entre la variable et l'axe considéré ; autant que ce coefficient est important autant que cette variable contribue dans la formation de l'axe. L'ACP, par son traitement multiparamétrique, permet de mettre en évidence les interactions entre les variables étudiées. En effet, la projection de toutes les variables dans l'espace factoriel décrit par l'ACP est exprimée par la coordonnée de la variable sur l'axe correspondant. Dans le cas d'une ACP normée, les coordonnées des variables sur les axes sont égales aux coefficients de corrélation de ces variables sur les axes. La description de la relation entre les variables est faite selon leurs directions dans le plan formé par deux composantes principales. Cette relation nous permet de voir comment les variables sont structurées. La part de variation d'une variable dans un plan peut être également expliquée en faisant la somme des r^2 (cosinus carrés d'angles) ou coefficient de corrélation au carré, correspondant aux axes qui le composent (Tableau 19). Alors il apparaît que toutes les variables, sont bien représentées dans le plan principal.

Tableau 18 : Corrélations des variables avec les axes principaux.

V_m	-0,70	0,49	-0,66	0,43	0,05	0,0025	-0,27	0,73	-0,03	
pH_m	-0,62	0,38	0,70	0,49	0,29	0,95	-0,20	0,04	-0,02	0,0004
T_m	0,93	0,86	0,12	0,0144	-0,23	0,53	-0,15	0,0225	-0,19	0,036
pH_f	0,96	0,92	0,03	0,0009	-0,03	0,0009	-0,22	0,0484	0,19	0,036
μ	-0,75	0,56	0,23	0,53	-0,61	0,37	-0,05	0,0025	0,05	0,0025

1^{ère} colonne : Corrélations entre les variables et les axes principaux

2^{ème} colonne : Corrélations au carré.

Le cercle de corrélation (Figure18) établi entre les deux premières composantes principales ne montre pas d'oppositions claires entre les groupes de variables et qu'elles sont proche de la périphérie du cercle, cela confirme qu'elles sont bien représentées (De La Garde, 1983). Les coefficients de corrélations entre les axes principaux et les variables, montre que les descripteurs T_m et pH_f sont fortement corrélés à l'axe 1 avec des corrélations au carré 0,86 et 0,92 chacun. Les variables V_m , pH_m et μ ayant des corrélations au carré de 0,43, 0,49 et 0,53 respectivement et sont beaucoup mieux corrélés à l'axe 2. Sur la base de ces données l'axe 1 sera représenté par les variables T_m et pH_f , et l'axe 2 par les variables V_m , pH_f et μ .

Etude des individus

Nous avons en définitif recherché une représentation des données facilitant la comparaison rapide des souches par l'ensemble de leurs caractères et leur regroupements. L'intérêt pratique par comportement similaire, le remplacement d'une souche par une autre ayant un caractère analogue devient facile et utile à la suite d'une attaque phagique par exemple. La projection des 23 individus sur le plan et en se rapportant aux distances de rapprochement entre ceux-ci. Grâce à cette notion de distance le repérage d'éventuels groupements devient possible.

Groupe 1 : Ce groupe comporte 08 souches qui représentent 34,78 % du total de l'isolat, de vitesse d'acidification de 2,34. Ce groupe renferme toutes les souches des différents laits de vache, chèvre et brebis les plus acidifiantes (vitesse d'acidité élevée en un temps court ($T_m = 4$)) avec des pH maximum très faibles. Sur le plan défini par les axes 1 et 2 nous pourrions distinguer clairement 03 groupes de souches :

Groupe 2 : Ce groupe comporte 12 souches qui représentent 52,18 % du total de l'isolat ayant des vitesses d'acidification moyenne, où V_m moyenne = 2,20 ; inférieure à celle du premier groupe. Ces souches sont caractérisées par des pH_m faible mais en un temps maximum T_m relativement supérieur à celui du premier groupe ($T_m = 8$). Toutefois, on remarque que l'individu 5 se comporte d'une manière différente de celle des autres individus du groupe 2. Ceci dit qu'on peut le traiter comme un individu à part ; ayant une $V_m = 3,83$ comparé à l'individu 3 du même

groupe et qui a une $V_m = 2,73$ et ayant en commun un $T_m = 8$, la souche 5, malgré sa vitesse élevée atteint un pH plus élevé que celui atteint par la souche 3 et est considérée comme une souche faiblement acidifiante par rapport à la majorité des souches du même groupe.

Groupe 3 : Ce groupe comporte 03 souches qui représentent 13,04 % de l'ensemble des souches étudiées, caractérisé par une vitesse d'acidification moyenne très faible par rapport à celle des deux premiers groupes V_m moyenne est égale à 0,810 et des T_m très lents ($T_m = 24$ h). Nous avons établi les profils de pH des souches isolées à 30°C et à 21°C car cette dernière est très utilisée pour la préparation des levains mésophiles dans les cuves de fabrication afin de maintenir les bactéries lactiques dans un pH optimal à leur activité et d'éviter leur dommage cellulaire et de reprendre leur croissance. L'examen des courbes représentées par les figures 20,21, 22 pour 30°C et 23, 24 et 25 pour 21°C montre en général, que le pouvoir acidifiant est plus important à 30 °C qu'à 21 °C. Les écarts dans les valeurs du pH deviennent plus importants après les deux heures de culture, correspondant à la fin de la phase de latence. Après 24 heures d'incubation, les niveaux d'acidité sont les plus élevés pour s'estomper par la suite au-delà des 48 heures.

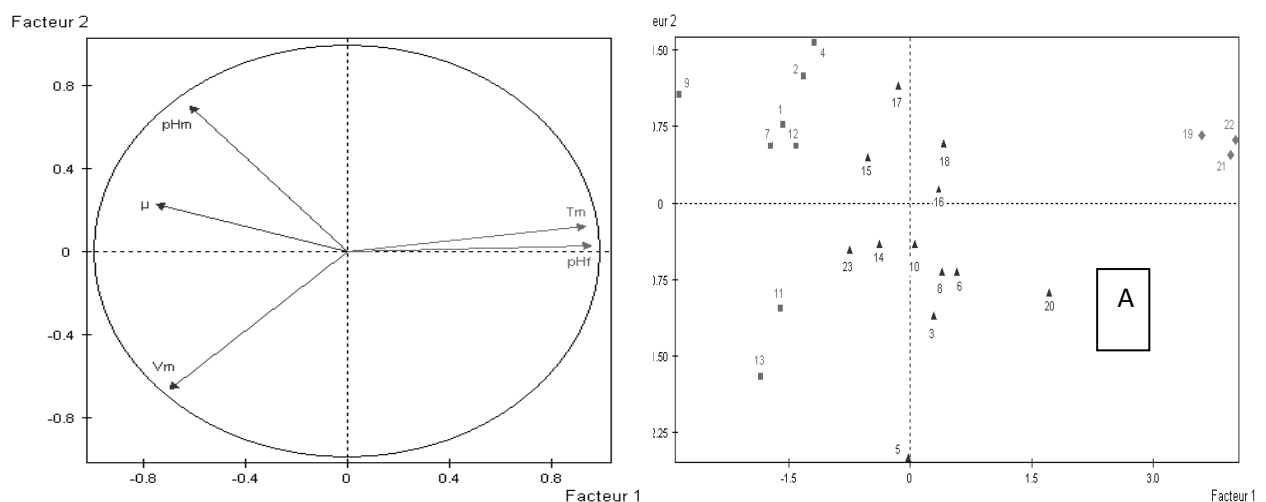


Figure 16 : Cercle de corrélation des variables A et Projection des individus sur le plan formé par entre les deux premiers axes B.

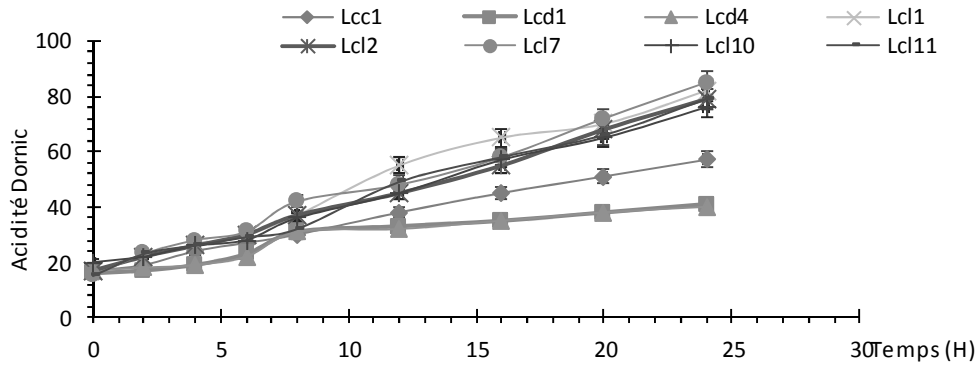


Figure 17 : Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine bovine.

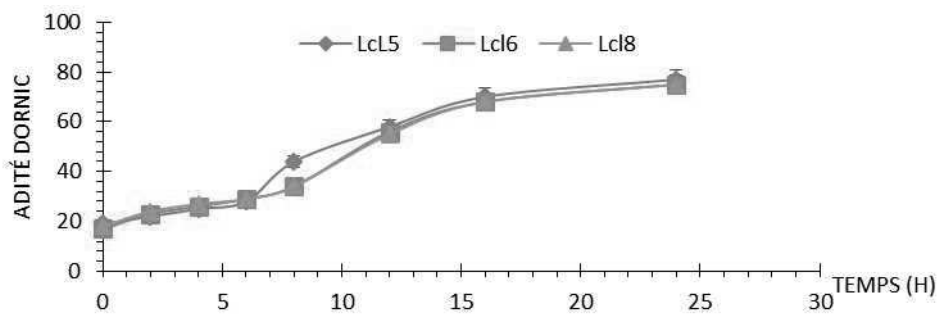


Figure 18 : Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine bovine (suite).

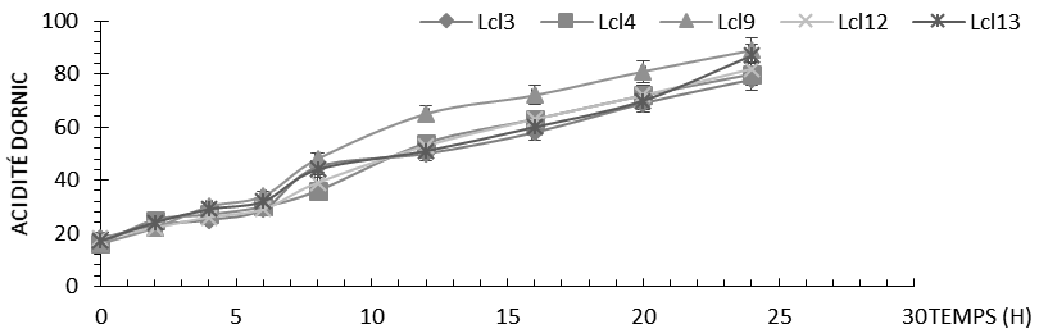


Figure 19 : Allure d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine caprine.

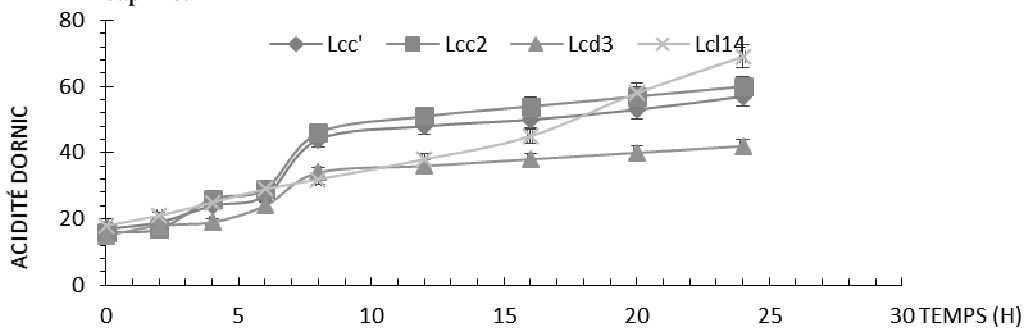


Figure 20 : Allures d'acidification (°D) du lait à 30°C en fonction du temps par les souches d'origine ovine.

Les résultats illustrés dans les figures 17,18, 19 et 20 pour la température de 30°C et 21,22 23 et 24 pour la température de 21°C montrent que l'allure générale de la cinétique d'acidification exprimée en degré Dornic est similaire pour les souches locales ainsi que pour les souches industrielles. D'autre part, les profils des pH représentant chaque groupe de souches mettent en évidence l'incidence de la température d'incubation sur l'acidification. Les cellules cultivées à 30°C atteignent plus rapidement des pH acides et séjournent donc plus longtemps dans cet environnement acide ; ceci entraînerait une baisse de leur viabilité. C'est ainsi que Lucas et Reyrolle (1989) ; Boquien et *al.* (1988) ont constaté que les souches de *Lactococcus lactis subsp lactis* semblent peu atteintes alors que la sous espèce *Diacetylactis* et surtout *Cremoris* sont sensibles à ce maintien à des acidités élevées et leur viabilités se voit donc diminuée. Il en ressort qu'afin d'assurer un équilibre constant entre les différentes espèces d'un levain multiple, il faut particulièrement veiller au respect des conditions de leur fabrication et contrôler le plus possible les modifications éventuelles des flores. Au vu de ces résultats nous pouvons avancer que nos souches isolées localement sont intéressantes sur le plan technologique. En effet, leur comportement vis à vis de l'acidité aux températures particulièrement utilisées en industrie laitière (21 et 30°C) est identique à celui des souches industrielles.

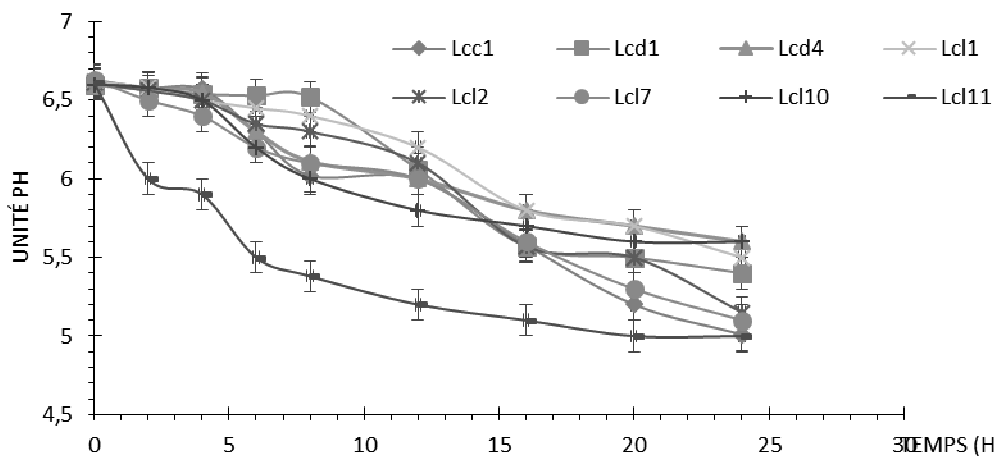


Figure 21 : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine bovine.

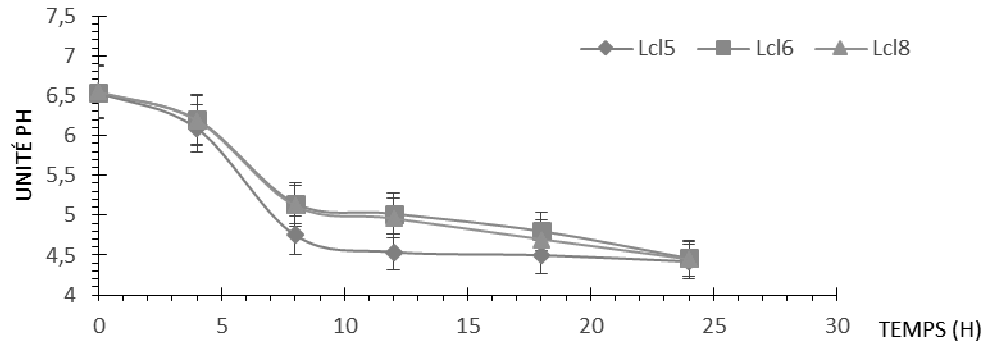


Figure 22 : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine bovine. (Suite)

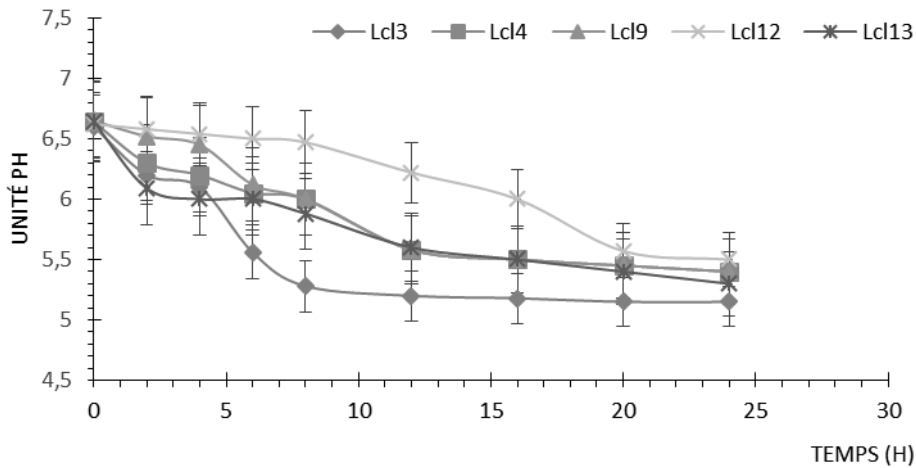


Figure 23 : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine caprine.

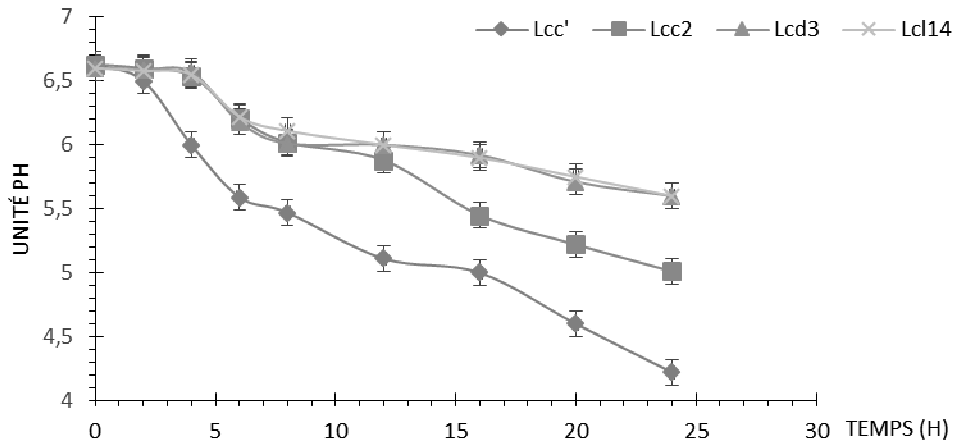


Figure 24 : Profil du pH à 21°C du lait en fonction du temps par des souches d'origine ovine.

7- La production d'amines biogènes

Différentes souches de bactéries lactiques sont soupçonnées d'être à l'origine de la formation d'amines biogènes (Gonzalez et al., 1998). Les systèmes enzymatiques de ces bactéries sont capables de décarboxyler des acides aminés (histidine, tyrosine etc.) et de former des composés (histamine, tyramine, etc.) à l'origine d'allergie s'ils sont consommés en quantités

importantes. L’histamine, résultante de la décarboxylation de l’histidine, est l’amine la plus toxique Certaines bactéries lactiques se trouvent parmi les germes les plus souvent incriminés dans sa genèse (Guiraud, 1998). Les résultats trouvés sont consignés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Détermination de la variation du pH avec et sans Histidine après 24 h d’incubation.

Souches	pH en présence d’histidine.	pH en absence de l’histidine	Souches	pH en présence d’histidine	pH en absence d’histidine
<i>Lc.L1</i>	4,24	4,21	<i>Lc.D4</i>	4,28	4,25
<i>Lc.L2</i>	4,30	4,30	<i>Lc.D3</i>	4,05	4,10
<i>Lc.L3</i>	4,36	4,35	<i>Lc.D2</i>	4,25	4,21
<i>Lc.L4</i>	4,26	4,24	<i>Lc.D1</i>	4,12	4,00
<i>Lc.L5</i>	4,35	4,35	<i>Lc.C*</i>	4,34	4,38
<i>Lc.L6</i>	4,36	4,32	<i>Lc.C'</i>	4,50	4,50
<i>Lc.L7</i>	4,46	4,46	<i>Lc.C2</i>	4,88	4,88
<i>Lc.L8</i>	4,45	4,45			
<i>Lc.L9</i>	4,39	4,42			
<i>Lc.L10</i>	4,45	4,46			
<i>Lc.L11</i>	4,37	4,37			
<i>Lc.L12</i>	5,05	5,15			
<i>Lc.L13</i>	5,12	5,10			
<i>Lc.L14</i>	5,24	5,20			
<i>Lc.L*</i>	4,20	4,20			
<i>Lc.C1</i>	4,12	4,15			

Les variations du pH sont négligeables et quasi nulles pour l’ensemble des souches. Ceci indique qu’aucune souche n’est à l’origine de la formation d’histamine après 24 heures d’incubation.

8 - L’antibioresistance :

La présence d’antibiotiques dans les laits peut être due au traitement des mammites. La plupart des bactéries y sont sensibles. Il n’est pas souhaitable de sélectionner, dans la composition des ferments, des souches résistantes aux antibiotiques, car ingérées par l’homme, elles sont susceptibles de transférer ces caractères aux autres bactéries du tube digestif. De plus, l’augmentation de l’ingestion d’antibiotiques par l’homme peut entraîner des risques d’allergie. Enfin, des bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent avoir, en plus, perdu certaines de leurs caractéristiques originelles. Le test d’antibiogramme des souches de *Lactococcus lactis* nous a permis de déterminer la sensibilité ou la résistance de ces souches vis à vis de quelques antibiotiques les plus usuels. Les antibiotiques testés appartiennent aux familles suivantes (tableau 20) : β -lactamines (Pénicilline, oxacilline et ampicilline), macrolides (érythromycines). Les résultats de ces tests sont regroupés dans le tableau 19 et nous remarquons que les souches *Lc.L5*, *Lc.L7*, *Lc.L10*, *Lc.L12*, *Lc.L13*, *Lc.L14*, *Lc.D2*, *Lc.D4* et *Lc.C'* sont sensibles vis-à-vis de l’ensemble des antibiotiques, la souche *Lc.L1* est résistante à l’oxacilline et l’ampicilline, la souche *Lc.L9* résistante à la pénicilline, les souches *Lc.D1* et *Lc.L11* sont résistantes à

l'érythromycine et l'ampicilline et enfin les souches industrielles sont sensibles à tous les antibiotiques testés.

Tableau 20 : Antibiogramme des souches de *L.lactis*

Souches	Pénicilline V	Oxacilline	Ampicilline	Erythromycine	Vancomycine
Lc.L1	S	R	R	L	S
Lc.L2	S	R	S	R	S
Lc.L3	S	S	R	S	S
Lc.L4	R	S	S	S	S
Lc.L5	S	S	S	S	S
Lc.L6	S	L	L	R	S
Lc.L7	S	S	S	S	S
Lc.L8	R	S	S	S	S
Lc.L9	R	S	S	S	S
Lc.L10	S	S	S	S	S
Lc.L11	S	L	R	R	S
Lc.L12	S	S	S	S	S
Lc.L13	S	S	S	S	S
Lc.L14	S	S	S	S	S
Lc.L*	S	S	S	S	S
Lc.C1	L	S	S	S	S
Lc.C2	L	S	S	S	S
Lc.C'	S	S	S	S	S
Lc.C*	S	S	S	S	S
Lc.D1	S	S	R	R	S
Lc.D2	S	S	S	S	S
Lc.D3	R	S	S	S	S
Lc.D4	S	S	S	S	S

9 -

Activité protéolytique

L'activité protéolytique est nécessaire au métabolisme azoté des bactéries lactiques et intervient sur les caractéristiques des produits laitiers fermentés. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Appréciation qualitative de l'activité protéolytique des cultures pures de *lactococcus lactis* à 30°C sur lait de Sherman après 24heures d'incubation.

Souches	Activité protéolytique				
	AAP	Lc.C1	AAP	Lc.L9	AAP
Lc.L2	AAP	Lc.C2	AP	Lc.L10	AP
Lc.L3	AAP	Lc.C'	AP	Lc.L11	AP
Lc.L4	AP	Lcc*	AAP	Lc.L12	/
Lc.L5	P	Lc.D1	AP	Lc.L13	AP
Lc.L6	AP	Lc.D2	AAP	Lc.L14	/
Lc.L7	AAP	Lc.D3	P	Lc.L*	AAP
Lc.L8	AAP	Lc.D4	AP		

A : acidification ; **A** : alcalinisation ; **P** : peptonisation ; / : pas de modification

Les résultats mentionnés dans le tableau permettent de selon le comportement dans le lait bleu de Sherman :

- Acidifiantes, Alcalinisante et Peptonisantes : Lc.L₁, Lc.L₂, Lc.L₃, Lc.L₇, Lc.L₈, Lc.L₉, Lc.C₁ et Lc.D₂
- Acidifiantes et Peptonisantes : Lc.L₄, Lc.L₆, Lc.L₁₀, Lc.L₁₁, Lc.L₁₃, Lc.C₂, Lc.C₃, Lc.D₁, Lc.D₄
- Peptonisantes : Lc.L₅, Lc.D₃
- Ne modifient pas le milieu : Lc.L₁₄, Lc.L₁₂

Le système protéolytique des bactéries est constitué, de deux types d'enzymes distinctes les protéases et les peptidases. L'efficacité du système chez une souche sauvage (prt+) de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* lui permet de se développer avec un temps de génération de 30 mn à 30°C. La croissance de plusieurs souches de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* dans le lait apparaît limitée par la faible vitesse de la protéolyse des caséines du lait : les acides aminés les plus limitants étant la L-leucine et la l-phénylalanine. La limitation de la croissance dans le lait serait plutôt due à la faible disponibilité de di ou tripeptidases contenant ces deux acides aminés.

En plus de son action sur la coagulation du lait lors de la croissance des bactéries lactiques, la protéolyse d'origine bactérienne est essentielle à l'affinage des fromages par le développement des saveurs et de la texture (Law, 1984). La protéolyse peut générer des peptides de poids moléculaire variant de 1 à 12 KDa responsables de l'amertume de certains fromages durs ou semi-durs (Stadhouders et al., 1983).

10 - Production du diacétyle

Les souches que nous avons retenues pour cette activité sont celles qui produisent du diacétyle ; il s'agit des souches de *Lactococcus lactis biovar Diacetylactis*. Lcd₁, Lcd₂, Lcd₃ et Lcd₄. Les quatre souches ont été cultivées sur lait de vache et incubées à 21°C. Les résultats de la production du diacétyle sont illustrés dans la figure 25. Ils montrent que la production ne devient significative qu'à partir de 24 heures de croissance et chute brutalement au-delà. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la souche LCD₄ qui produit 2.74 ppm de diacétyle après 24 heures de croissance.

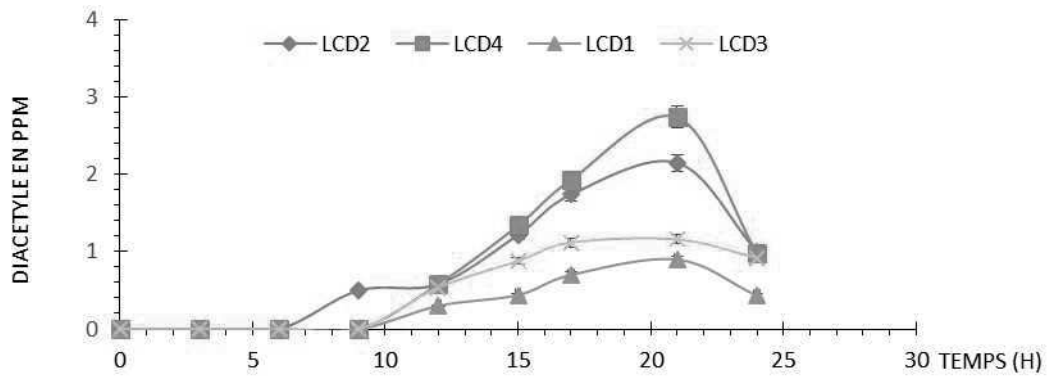


Figure 25 : Production du Diacétyle par les souches de *Lactococcus lactis subsp Diacetylactis* sur lait de vache à 21°C.

La formation du diacétyle démarre tardivement, ce phénomène a déjà été remarqué par certains auteurs comme Oberman et *al.* (1982) qui expliquent que les souches de *Lc. L biovar Diacetylactis*, étant de pouvoir acidifiant faible mettent un certain temps (entre 6 et 9 h) pour abaisser le pH à un niveau favorable à la production du diacétyle. Selon Desmazeaud (1983) la première enzyme induite dans le métabolisme du citrate, la citrate perméase, de pH dépendante, ne devient fonctionnelle qu'à des valeurs de pH inférieures à 6. De ce fait, nous remarquons que la souche Lc.D₂ qui est la plus acidifiante débute la production du diacétyle après 6 h de culture contrairement à la souche Lc.D₄ qui n'acidifie qu'après 9 h de culture. Au-delà de 17 - 18 h une baisse maximale de pH est notée. Par contre Lcd₁ et Lcd₂ produisent des quantités plus faibles de diacétyle. La teneur en diacétyle décroît progressivement par la suite en raison de l'activité de la diacétyle-réductase impliquée dans la réduction du diacétyle en acétoïne.

Cette réaction est irréversible. Les composés responsables de l'arôme des divers produits laitiers sont nombreux parmi lesquelles le diacétyle, l'acétaldéhyde et probablement le CO₂ et l'acétate sont les plus importants. Certains auteurs tels que Camus et *al.* (1951) attribuent cette faculté également à l'acétoïne. Par contre, d'autres auteurs (Cogan, 1980 ; Sharp, 1978) affirment que l'acétoïne n'a ni saveur ni odeur. Tous les composés aromatiques résultant de la dégradation du citrate qui, même n'étant présent dans le lait qu'en faible quantité (environ 8,3 mM) ils n'en représentent pas moins une constituante clef (Cogan, 1980).

Le diacétyle et l'acétoïne sont presque toujours étudiés ensemble. En fait ils sont très liés puisque le diacétyle donne par réduction l'acétoïne. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, seul le diacétyle est aromatique. Selon Bassit et *al.*, (1994) qui ont étudié l'effet de la température sur la production du diacétyle en utilisant une culture pure de *Lc. Diacetylactis* CNRZ 483, avaient remarqué que la production du diacétyle était plus élevée à la température de 18 et 21 °C que celle de 30 °C. Cependant Oberman et *al.* (1982) démontrent que la production du

diacétyle augmente de 30 % quand la température de culture augmente de 23 °C à 28 °C en culture mixte. Cette contradiction est probablement due au fait que, dans une culture mixte, la cinétique de production du diacétyle est différente de celle d'une culture pure de *Lc.l biovar Diacétylactis*. (tableau 22)

Tableau 22 : Production du diacétyle par Lc.D₁, Lc.D₂, Lc.D₃ et Lc.D₄ sur lait de vache, de brebis et de chèvre.

Animal	Lcd ₁	LcD ₂	LcD ₃	LcD ₄
Vache	0,90 ± 0,3	2,27 ± 0,45	1,16 ± 0,36	2,73 ± 0,50
Brebis	0,80 ± 0,5	1,242 ± 0,52	0,81 ± 0,52	1,74 ± 0,51
Chèvre	0,65 ± 0,7	1,097 ± 0,55	0,98 ± 0,44	1,63 ± 0,42

Les valeurs de diacétyle obtenues sur lait de vache sont supérieures à celles trouvées sur les laits de chèvre et de brebis. Un maximum de 2,73 ppm par la souche LcD₂ est enregistré mais qui reste faible comparée au ferment industriel *Lc.L biovar Diacétylactis* (21,7 ppm). Comparativement à une souche de *Leuconostoc cremoris*, Cogan (1980) trouve que le maximum de diacétyle produit est de 6 ppm dans un milieu enrichi de 0,3 % d'extrait de levure. Par ailleurs, Sharpe, (1978) a trouvé que l'utilisation du citrate était plus active à des pH bas. Cogan (1981) a remarqué que le maximum du diacétyle coïncide toujours avec la disparition des citrates, il en conclut l'existence d'un effet répressif des citrates sur la diacétyle – réductase.

Cette remarque a déjà été faite par Pette en 1964 qui suggéra même l'addition au lait de 0,15 % de citrate de sodium pour retarder la réduction du diacétyle. D'après les résultats obtenus dans cette étude, l'addition de 0,20% de citrate de sodium au lait de vache ne semble pas stimuler la croissance de *Lc. Diacétylactis 4* et les valeurs de diacétyle obtenus en fin de croissance restent inchangées.

11 - Caractérisation *in vitro* du potentiel probiotique

la recherche de nouvelles souches probiotiques est important dans le but de satisfaire le besoin croissant du marché et d'obtenir des produits fonctionnels dans lesquels les cultures probiotiques sont plus actives et présentent des caractéristiques meilleurs que celles existantes (Verdenelli et al., 2009 ; Longdet et al., 2011).

Parmi les effets bénéfiques sur la santé humaine la réduction de l'intolérance au lactose, l'abaissement du niveau de cholestérol sérique, la digestion des protéines et des lipides et l'activité antagoniste à l'encontre de pathogènes (Klaenhammer, 1998; Perdigon et al., 2002; Gaudana et al., 2010).

11.1 - Réduction du cholestérol

Le niveau élevé du cholestérol sanguin est généralement considéré comme un facteur de risque en pathologie cardiovasculaire. Son abaissement est important dans la prévention envers cette maladie. Il ressort des expériences menées sur l'étude cinétique d'élimination du cholestérol durant les 144 heures (figures 26,27 et 28) (en condition anaérobie sur milieu MRS à 37°C) ce qui suit :

- Toutes les souches testées sont capables de réduire le cholestérol.
- l'existence de fortes variations selon leur origine et même entre les souches au sein du même isolat de la même origine animale et entre les sous espèces.
- Le taux de réduction progresse en fonction du temps et est compris entre 5 et 75%. Le maximum est atteint après 144 heures de culture.

Après 24 heures de croissance l'analyse des résultats montrent que le taux d'atténuation du cholestérol atteint est de :

- 20% pour les souches *LcC₁*, *LcL₂*, *LcL₁₀*, *LcL₉*, *LcD₃* et *LcL₁₄*
- 10% et moins de 20% pour les souches *LcC₂*, *LcD₁*, *LcL₁*, *Lc C'* et *LcC₂*
- moins de 10% pour les souches *LcD₄*, *LcL₇*, *LcL₁₁*, *LcL₃*, *LcL₄*, *LcL₁₂* et *LcL₁₃*

Le même comportement est remarqué après 48 heures de culture avec un minimum de 10,91 % pour *LcL₁₃* est un maximum de 43,25% pour *LcL₂*. Après 144 heures de d'incubation le taux global d'élimination du cholestérol est supérieur à 50% avec une performance notable de 75,44% chez la souche *LcD₃*. Le tableau ci-dessous (23) est une récapitulation présentant les souches les plus et les moins performantes en relation avec la croissance après 24 heures d'incubation. Les niveaux de biomasses viables dénombrés sur MRS gélosé semblent être identiques pour l'ensemble des souches. Il ressort de l'analyse des résultats que la baisse du cholestérol dans le milieu ne suit pas uniquement la charge cellulaire. La majeure partie des publications sur les probiotiques concerne les espèces commensales de l'intestin humain en l'occurrence celles qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Leur comportement vis à vis du cholestérol est comparable à celui de nos souches. A titre d'exemple Hoda Mahrous (2011) dans ces recherches sur les souches probiotiques *Lb. Acidophilus*, *Lb. Plantarum* et *Lb. Pentosus* isolats infantiles d'Egypte trouve qu'elles éliminent le cholestérol dans l'intervalle de 4 à 24% en 24 heures.

Tableau 23 : Performance des souches dans l'élimination du cholestérol

Souches	Cholestérol éliminé		Log ₁₀ ufc.ml ⁻¹
	Performantes		
	en µg/ml %		en
<i>LcC1</i>	25,65 ± 0,90		11,49
<i>LcD3</i>	21,12 ± 1,02		11,17
<i>LcL2</i>	21,74 ± 1,08		11,46
	Moins performantes		
<i>LcL13</i>	3,40 ± 0,56		11,36
<i>LcL4</i>	3,45 ± 0,85		11,43
<i>LcL7</i>	3,75 ± 0,96		11,62

Geeta et son équipe (2010) trouvent que dans le yaourt la réduction du cholestérol est meilleure, elle varie de 29 à 57% selon les souches de lactobacille utilisées. Pereira et Gibson (2002) dans leurs travaux sur le potentiel probiotique de souches humaines de *Bifidobacterium* trouvent qu'après 12 heures de culture le cholestérol assimilé varie de 0,4 à 47% dans le meilleur des cas en présence de la bile qui joue le rôle de promoteur dans l'élimination du cholestérol. Kimoto et *al.* (2007) en comparant une souche probiotique *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 avec des souches du genre lactococcus trouvent que les sous espèces *Diacetylactis* éliminent après 24 heures de culture 78,6 à 97,3% du cholestérol existant dans le milieu de culture. Les souches de la sous espèce *lactis* viennent en deuxième position avec un taux d'élimination variant entre 53,9 à 86,7 alors que la souche de référence *Lb acidophilus* vient en troisième position en réduisant le niveau du cholestérol de 52,9%.

La capacité d'extraire le cholestérol du milieu n'est pas dépendante uniquement à la biomasse mais plutôt à une activité spécifique des souches. En effet selon Izequiero (2009) il est généralement admis que les effets manifestés par une souche probiotique ne peuvent pas être extrapolés à une autre souche, même si elles appartiennent au même genre et à la même espèce.

L'activité probiotique est donc « souche-spécifique » ceci peut être expliqué par des différences métaboliques et physiologiques entre celles-ci. Le potentiel hypocholestérolemique des genres *lactobacillus* et *Bifidobacterium* est mieux documenté comparé aux lactocoques (Małgorzata, 2008 ; Starovoitova, 2010) en effet ces bactéries sont des membres de la flore normale de l'intestin. Ce n'est que récemment que les performances à réduire le cholestérol que ce soit in vitro ou in vivo des lactocoques sont étudiés parce qu'ils sont associés à beaucoup de produits lactofermentés.

Les résultats issus de nombreuses recherches montrent qu'ils possèdent une activité hypocholestérolemique (Małgorzata 2008 ; Ahn et *al.*, 2003) et confirment leur capacité à

réduire le niveau de cholestérol *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, les mécanismes d'actions impliqués dans la plupart de ces effets restent loin d'être élucidés. Selon Manoj *et al.* (2012) les bactéries probiotiques sont capables de réduire le cholestérol selon les mécanismes suivants :

- Son assimilation en cours de croissance ;
- Sa fixation à la surface cellulaire ;
- Son incorporation à l'intérieure de la membrane cellulaire ;
- Déconjugaison de la bile via la Bile Salt Hydrolase (BSH) et coprécipitation du cholestérol avec la bile deconjuguée ;

Cependant tous ces mécanismes dépendent de la souche et des conditions de culture imposés au laboratoire qui ne sont pas pratiqués *in vivo*. Les résultats des recherches montrent des différences de comportement intimement associés au genre, et souche de bactéries lactiques. De plus la capacité à réduire le cholestérol sérique chez les probiotiques est étroitement liée à l'activité de la BSH.

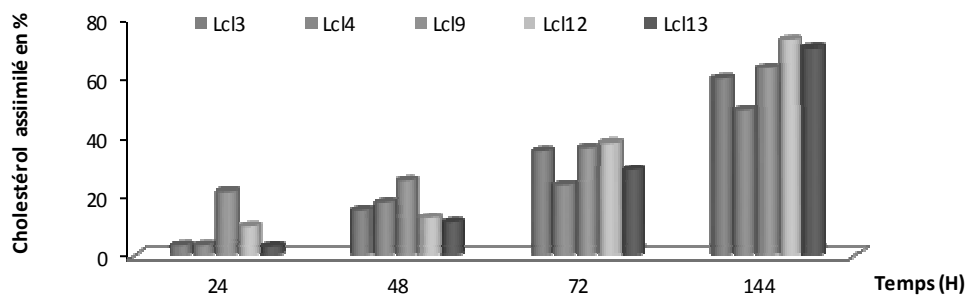


Figure 26 : Cholestérol assimilé par les isolats de lait de chèvres en fonction du temps.

Récemment l'activité hypocholestérolemique chez les probiotiques a été associé *in vitro* à l'activité de la BSH qui a été retrouvée chez l'humain et l'animal. Le mécanisme avec lequel les bactéries lactiques éliminent le cholestérol à partir de milieux de laboratoire a été étudié. Il est reporté que le cholestérol est assimilé à partir de sa forme micellaire par Déconjugaison et précipitation avec les sels biliaries libres quand le pH du milieu est à la baisse par acidification durant la croissance

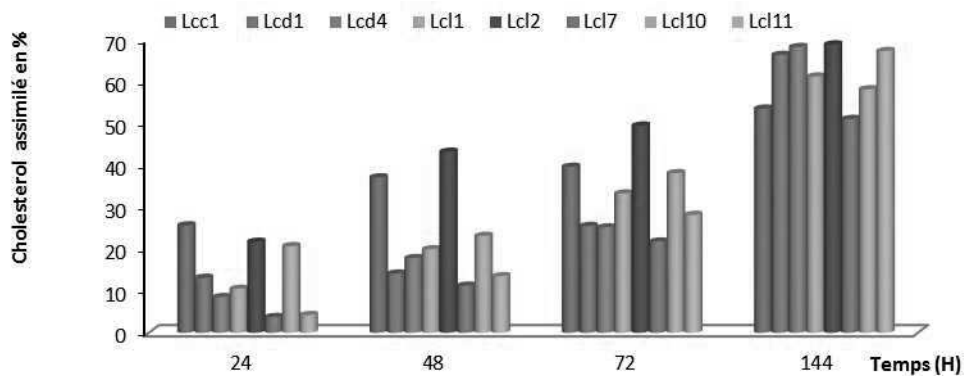


Figure 27 : Cholestérol assimilé par les isolats de lait de vaches en fonction du temps.

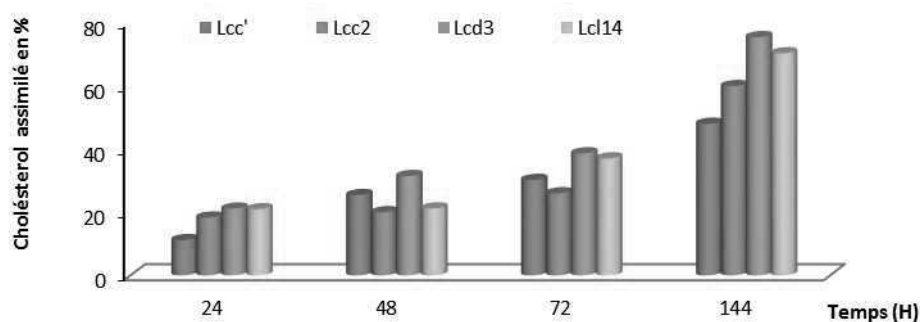


Figure 28 : Cholestérol assimilé par les isolats du lait de brebis en fonction du temps

11.2 -Dégradation des triglycérides

Le comportement envers les triglycérides est similaire à celui du cholestérol (figure 29,30 et 31). Quel que soit l'origine animale de la souche et de la sous espèce, les niveaux de dégradation augmentent en fonction du temps de contact et atteignent des taux supérieurs à 70%. Les résultats mettent en évidence une supériorité des souches d'origine ovine.

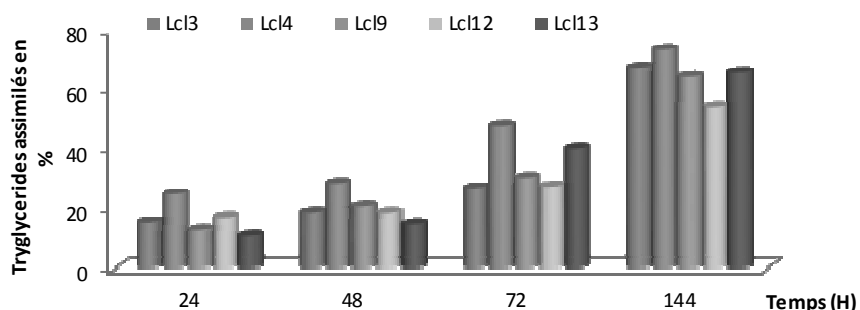


Figure 29 : Dégradation des triglycérides par l'isolat de laits chèvres en fonction du temps.

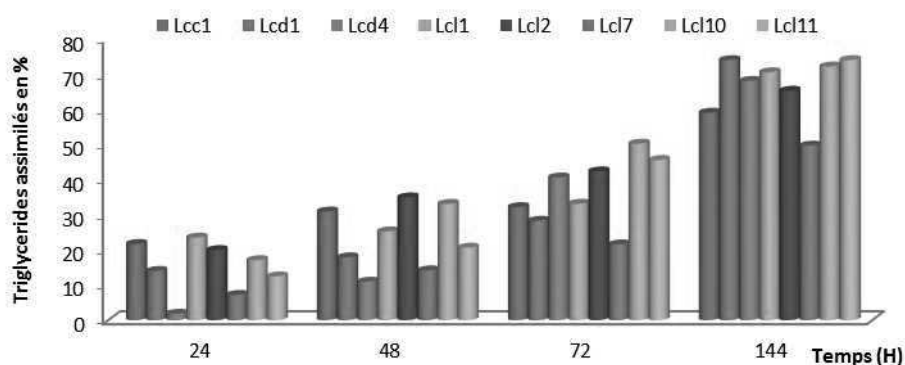


Figure 30 : Dégradation des triglycérides par l’isolat de laits de vaches en fonction du temps.

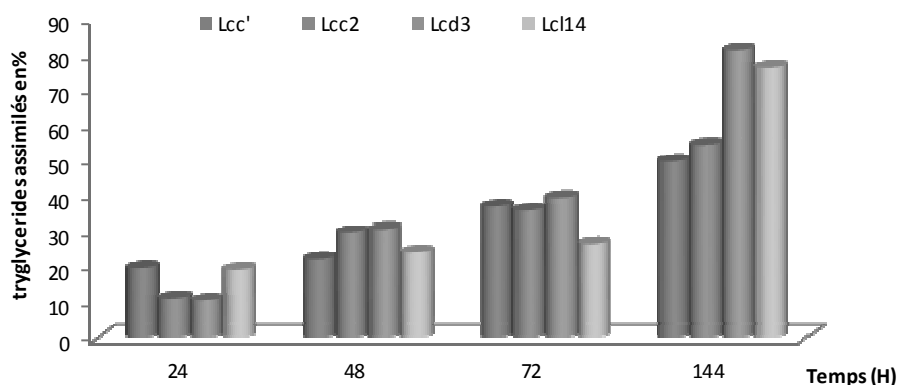


Figure 31 : Dégradation des triglycérides par les souches de laits de brebis en fonction du temps

11.3 - Dégradation du lactose

L’activité lactasique est l’une des principales fonctions des bactéries probiotiques. La diminution des symptômes dus à l’intolérance au lactose causée par la diminution dans l’intestin de la β -galactosidase a été un des premiers effets documentés des probiotiques (Marteau et *al.*, 2002) et est principalement dû à la production de cet enzyme par de nombreuses bactéries probiotiques. Lorsque libéré dans l’intestin, il permet l’hydrolyse du lactose et améliore sa digestion, diminuant du même fait les symptômes associés ou non au métabolisme de ce sucre (De Vrese et *al.*, 2001 ; Marteau et *al.*, 2001; Marteau et *al.*, 2002).

Les résultats trouvés et illustrés par les figures 32, 33 et 34 montrent que pour l’ensemble du souchier, la cinétique de dégradation du lactose est quasiment identique. Elle est progressive et atteint les niveaux d’hydrolyse de 50% après un temps de contact de 144 heures. Les profils de dégradation du lactose se ressemblent quel que soit l’origine animale du lait ou la souche et de la sous espèce considérée.

Figure 32 :
Lactose dégradé en %
isolats du lait
vaches en
fonction du

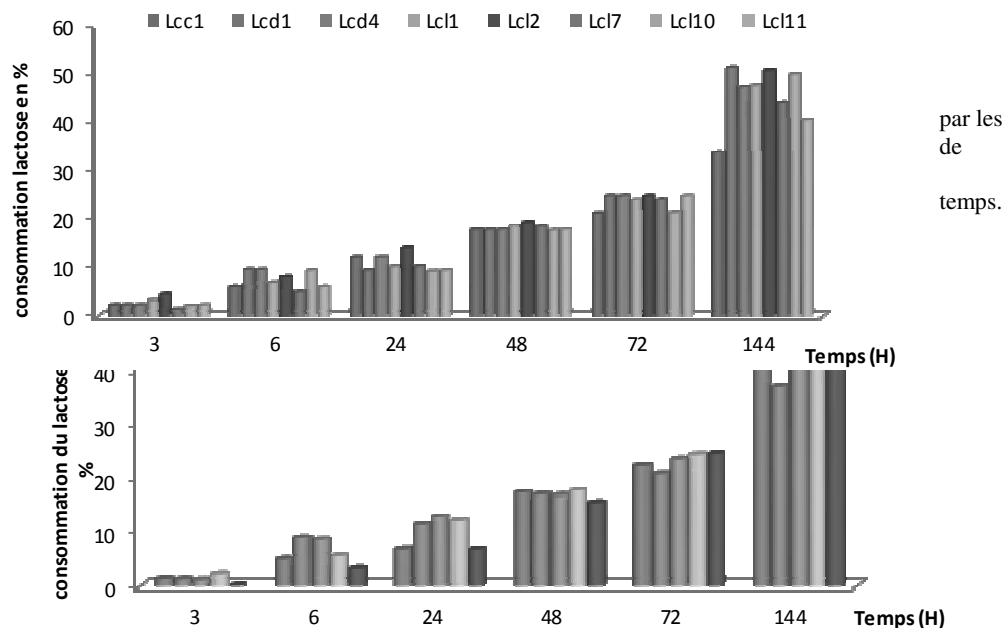


Figure 33 : Lactose dégradé en % par les isolats du lait caprin en fonction du temps.

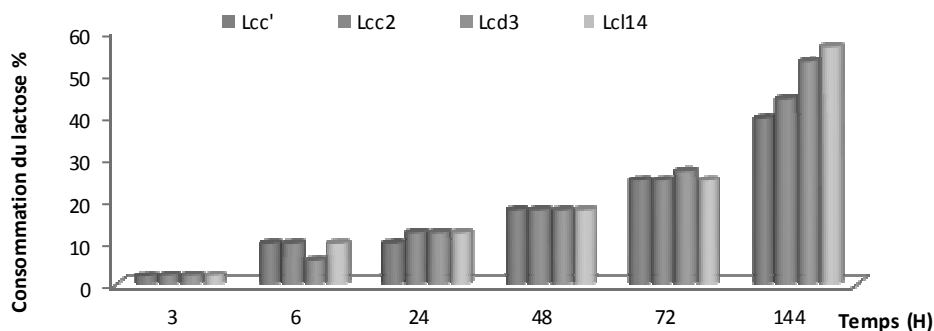


Figure 34 : Lactose dégradé en pourcent par les souches du lait de brebis en fonction du temps.

11.4 - Résistance aux conditions gastro-intestinales simulées

11.4.1 - Résistance aux conditions acides

La capacité potentielle de survie des bactéries lactiques dans le tractus gastro-intestinal est une exigence pour les bactéries probiotiques ingérées (Martin *et al.*, 2006). Le premier stress qu'elles subissent est l'acidité gastrique. Dans cette expérience nous avons simulé les contraintes d'acidité (acidité et pepsine). Les effets de l'acidité sur la survie des souches sont illustrés dans les figures 35, 36 et 37 où les niveaux d'acidité sont arrangés selon l'ordre décroissant du pH. La plus grande réduction du nombre est enregistrée à pH 2,5. Les niveaux de cultivabilité sont les plus faibles après trois heures d'incubation (inférieurs à 1log). L'incidence de cette acidité s'estompe au fur et à mesure que le pH de l'environnement augmente. A pH 6,5 le nombre d'unités cultivables est au maximum.

Ces constats sont notés pour l'ensemble des souches quel que soit leur origine animale ou le comportement envers l'acidité est assez similaire. La réduction du nombre d'unités cultivables est au environ de 1log entre le pH de 4,5 et de 6,5 par contre les écarts enregistrés à pH 2,5 et comparés aux pH de 4,5 et 6,5 sont hautement significatifs. La résistance à l'acidité des souches du genre lactococcus et même à l'échelle de sous espèce n'est pas significativement différente a aucun des pH testés.

Etant donné que toutes les souches ont quasiment la même tolérance à l'acidité, cette propriété n'a pas permis leur discrimination. Les mêmes observations ont été rapportées par Izquierdo (2009) dans ses études sur les souches de *Lb plantarum*. Il est reporté que plusieurs souches sont plus tolérantes aux conditions acides que d'autres que ce soit à cause de la capacité élevée de leur pouvoir tampon (pH 3,72 - 7,74) ou soit aux ATPases membranaires qui au retour résistent aux changements du pH cytoplasmique et gagnent de la stabilité sous les contraintes acides de l'estomac (pH 2,5) du duodénum (4,5) et de l'intestin (6,5) (Ritus et al., 1994 ; Berada et al., 1991).

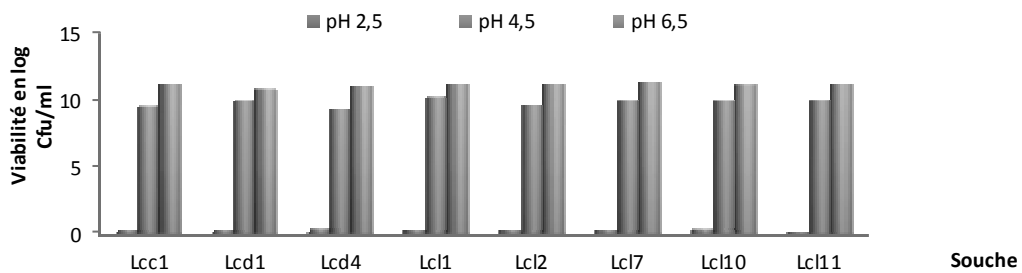


Figure 35 : Viabilité des isolats d'origine bovine à pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.

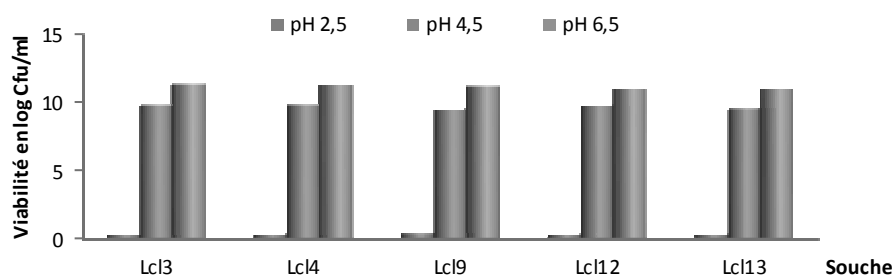


Figure 36 : Viabilité des isolats d'origine caprine a pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.

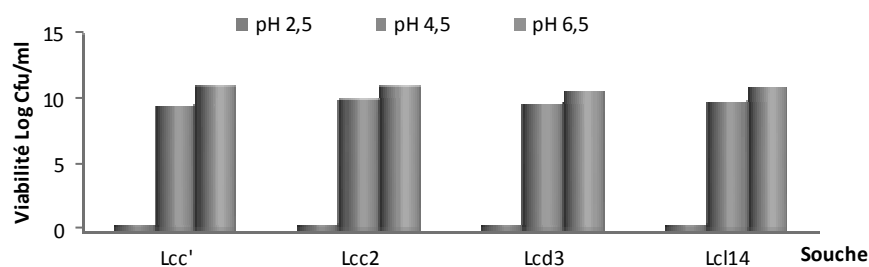


Figure 37 : Viabilité des isolats d'origine ovine a pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.

11.4.2 - Croissance en présence de bile

La tolérance à la bile est l'une des caractéristiques recherchées lors de la sélection des bactéries probiotiques. Les candidats doivent transiter via le duodénum en plus grand nombre de cellules viables pour atteindre leur site d'action et se multiplier. Après le passage par l'estomac, les bactéries arrivent au duodénum où est sécrétée la bile. A ce niveau, certains composants de la bile, notamment les acides biliaires comme l'acide cholique, compromettent sérieusement la viabilité des bactéries ingérées. La capacité de survie peut être modifiée par la présence de bile qui peut provoquer un stress chez les cellules sensibles. Contrairement à l'acidité qui s'estompe après le passage gastrique, l'action de la bile persiste plus longtemps sur les cellules ayant survécu au passage gastrique. Ainsi il est plus judicieux d'observer la capacité de croissance des candidats exposés à la bile pendant un temps donné. Dans cette expérience, les souches ont été mises en culture dans un bouillon MRS supplémenté de bile à 0,3% à pH 2.5, 4.5 et 6.5 à 37°C et dans le même milieu en absence de bile, et leur croissance a été suivie en dénombrant les cellules cultivables sur MRS gélosé. La présence de bile provoque un retard de croissance visible plus ou moins important selon les souches du à l'élimination d'une partie de la population bactérienne initiale. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures de 38 à 46.

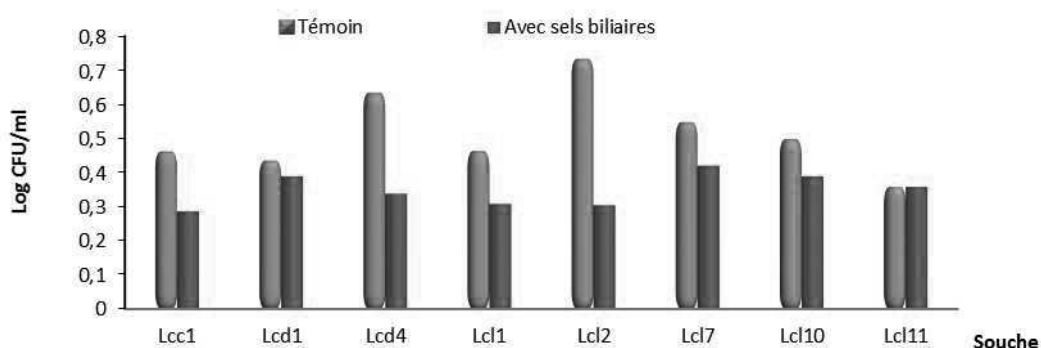


Figure 38 : Viabilité des isolats d'origine bovine a pH 2,5, 4,5 et 6,5 après 03 heures à 37°C sur MRS.

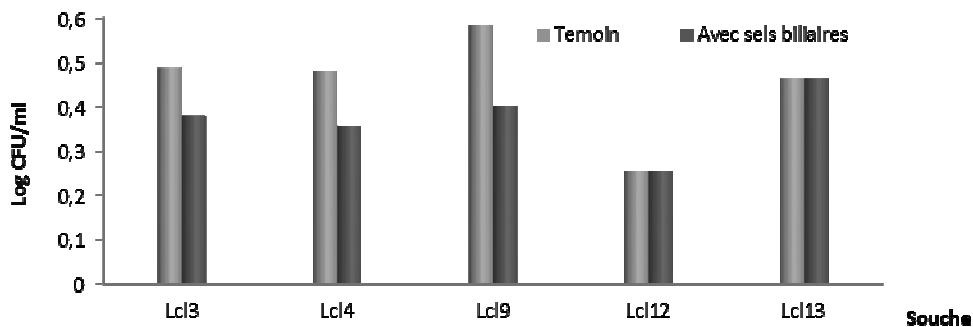


Figure 39 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 2,5 des souches d'origines caprines.

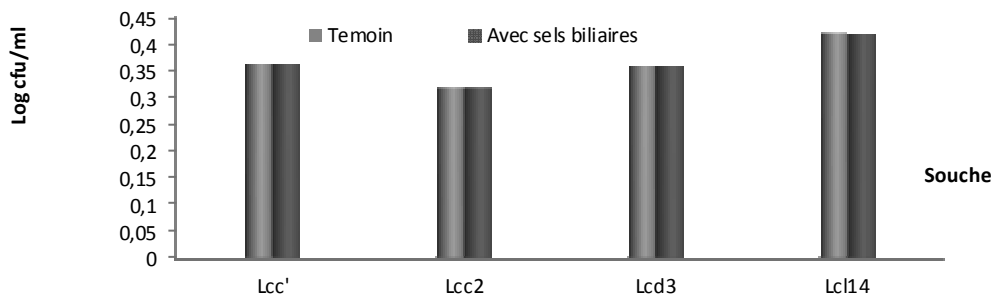


Figure 40 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 2,5 des souches d'origines ovines.

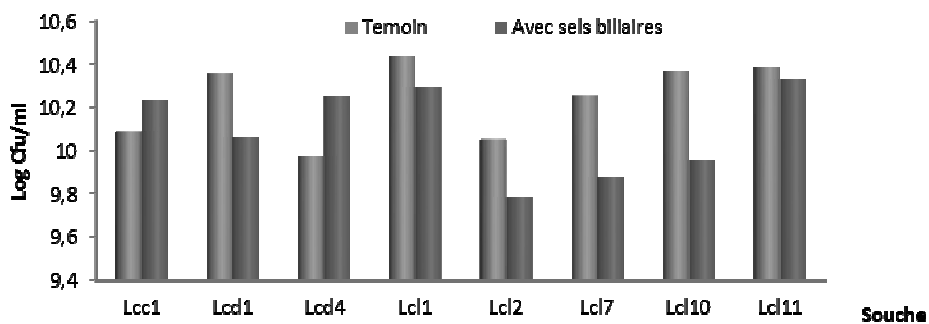


Figure 41: Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 4,5 des souches d'origines bovine.

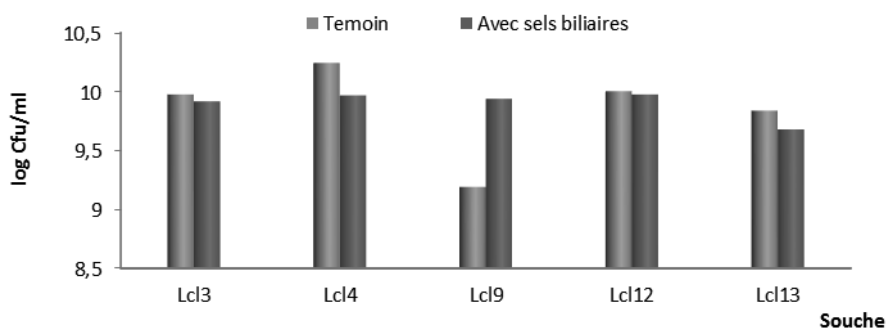


Figure 42 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaires à pH 4,5 des souches d'origines caprine.

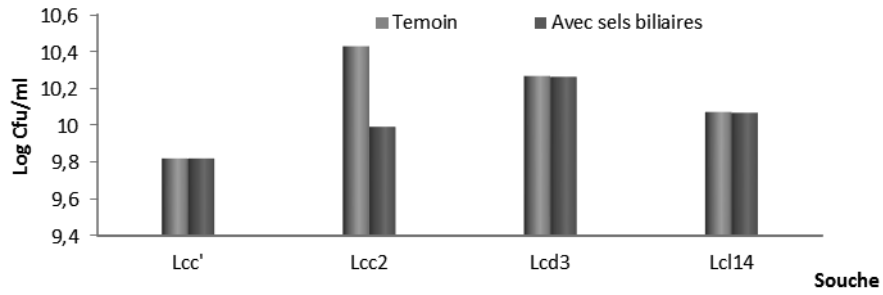


Figure 43 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 4,5 des souches d'origines ovine.

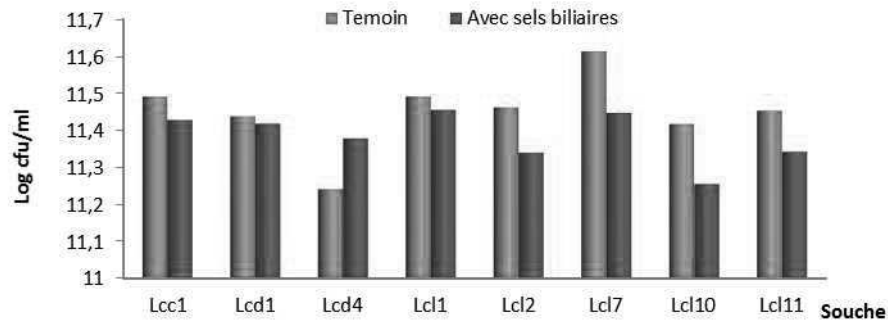


Figure 44 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 6,5 des souches d'origines bovine.

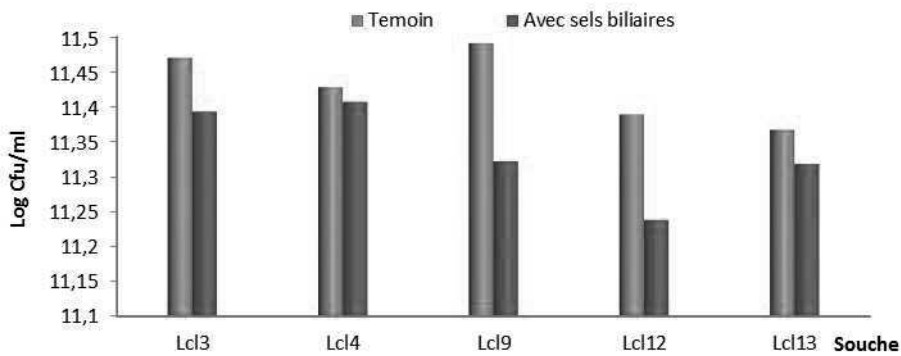


Figure 45 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 6,5 des souches d'origines caprine.

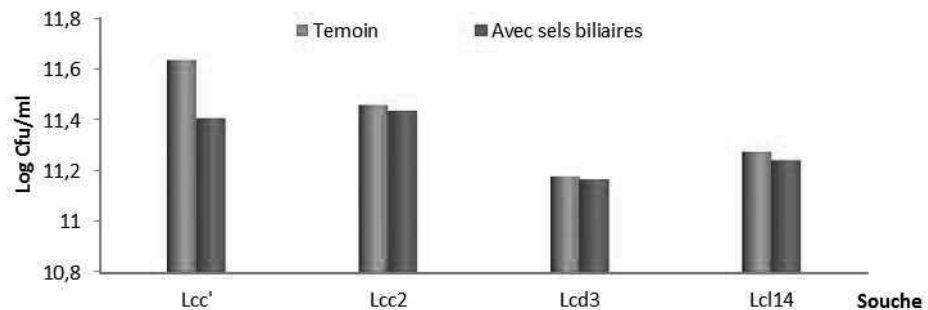


Figure 46 : Croissance après 24 heures en absence et en présence de 0,3% de sels biliaries à pH 6,5 des souches d'origines ovine.

En ce qui concerne la résistance aux conditions gastro-intestinales, deux aspects différents ont été évalués : la résistance à l'acidité et la tolérance à la bile. La résistance à l'acidité et la croissance en présence de bile des souches suivent la même tendance. Elles montrent une meilleure survie en milieu acide et présentent aussi les meilleures croissances en présence de bile. Cependant, la même corrélation n'a pas pu être observée. Les souches, qui ont un comportement similaire face à l'acidité, se comportent de manières très différentes lorsqu'il s'agit de résister à la bile. Ceci peut être dû à des caractéristiques spécifiques des souches qui leur confèrent une bonne tolérance à la bile, mais qui ne protègent pas contre l'acidité.

Lorsque l'on considère des probiotiques commerciaux, comme par exemple ceux de *Bifidobacterium* ou de *Lactobacillus*, il apparaît que ceux-ci ne présentent pas forcément les meilleures caractéristiques. Ces souches ont en effet des niveaux de croissance, de résistance à l'acidité et à la bile très bas. Même si elle peut exercer un certain effet probiotique pendant son passage à travers le tractus gastro-intestinal, l'effet bénéfique sur l'hôte risque d'être significativement réduit en raison de la perte de viabilité et du manque d'adhésion, qui se traduiraient par des temps de résidence courts. Ceci suggère que les probiotiques déjà connus, sur lesquels est focalisée une partie importante de la recherche réalisée actuellement, peuvent ne pas être les meilleurs modèles d'études et que de nouveaux isolats pourraient s'avérer beaucoup plus appropriés. La sélection des souches est par conséquent une des étapes clef qui déterminent l'efficacité des probiotiques et leurs applications éventuelles.

Cette sélection est souvent réalisée par des tests *in vitro* qui prennent chacun en compte une propriété particulière, et ne permettent pas d'avoir une vision globale du métabolisme de la bactérie. Il est néanmoins important de définir les conditions des tests *in vitro* qui représentent au mieux le comportement *in vivo* et les interactions probiotique-hôte. A l'évidence, ces tests sont plus facilement concevables lorsqu'il s'agit de propriétés bactériennes, telles que celles étudiées ici, que dans le cas de propriétés probiotiques et d'effets réels sur l'hôte qui ne peuvent être correctement évalués qu'*in vivo*. Il convient par ailleurs de préciser, à la vue des résultats présentés, que le caractère probiotique d'une souche sera toujours basé sur un compromis entre certaines propriétés très bien exprimées et d'autres plus moyennes. En effet, il ne faut pas chercher le probiotique parfait, car une souche ne pourra pas réunir les meilleures caractéristiques par rapport à tous les critères.

Certaines souches pourront exprimer une propriété mieux que d'autres et elles seront sélectionnées sur la base de cette propriété, même si elles peuvent être peu performantes par d'autres aspects. Les propriétés recherchées en priorité seront différentes selon l'application envisagée pour le probiotique, et chaque souche aura une application bien spécifique. Finalement,

l'identification des éléments moléculaires à la base des effets probiotiques peut être une étape clef vers une classification des souches selon leurs potentialités probiotiques, et permettrait sans doute un jour de dépasser les limitations des tests in vitro. Cela contribuerait à une sélection des souches plus rationnelle et à une standardisation des critères d'évaluation des produits commerciaux.

11.4.3- Hydrophobicité :

Ce test permet d'évaluer l'hydrophobicité de la surface cellulaire des souches de bactéries lactiques vis-à-vis du KNO_3 qui peut refléter le potentiel de colonisation des bactéries lactiques aux mucus intestinale. La répartition des cellules entre la phase aqueuse et le KNO_3 résulte de l'interaction hydrophobe entre les microorganismes et les hydrocarbures. Les pourcentages obtenus de l'adhérence de ces bactéries lactiques au KNO_3 indiquent l'hydrophobicité de leur surface. Les résultats de ce test sont illustrés par les figures 47, 48 et 49.

Ces résultats montrent que les souches mises au test présentent une bonne hydrophobicité, cela témoigne d'une bonne sélectivité des surfaces membranaires. La valeur la plus élevée (70%) est enregistrée avec la souche *Lc lactis subsp cremoris* Lc L. C' et de (60%) avec les souches *Lc. lactis* subsp. *Diacetylactis* LCD₂ et *Lc lactis subsp cremoris* I C1, de (50%) et de (40%) avec *Lc lactis subsp lactis* L₉, L₂, L₃, L₃', *Lc. lactis* subsp. *Diacetylactis* LCD1, LCD4 alors que la plus faible (10%) est celle de L₇, L₁₂, C₂ et enfin L₁₀.

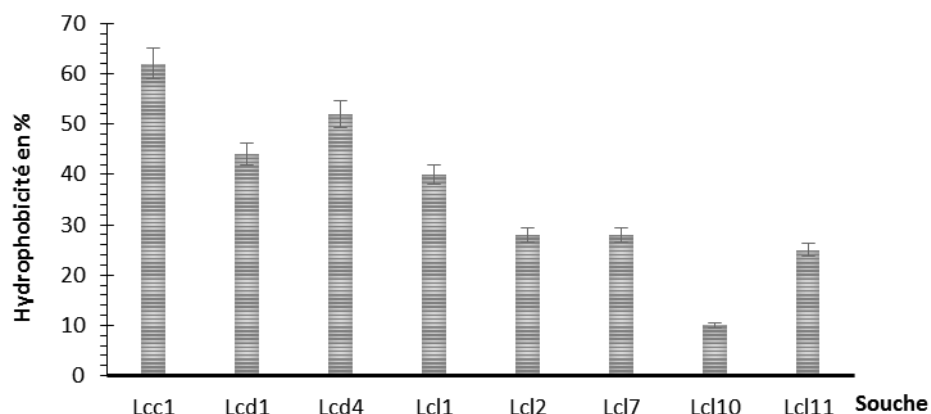


Figure 47 : Hydrophobicité des souches originaire du lait de vache

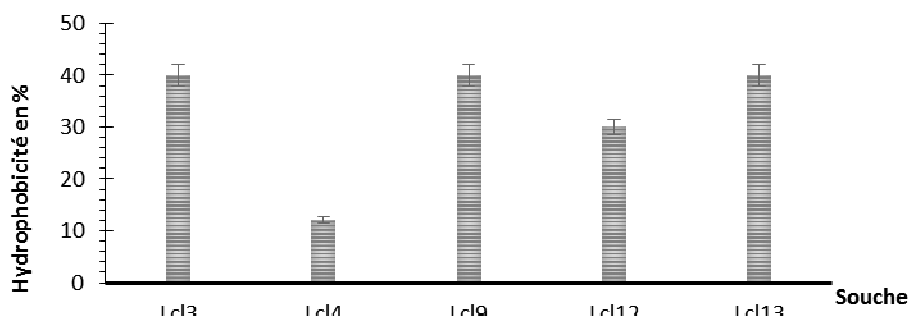


Figure 48 : l'hydrophobicité des souches originaire du lait de chèvre.

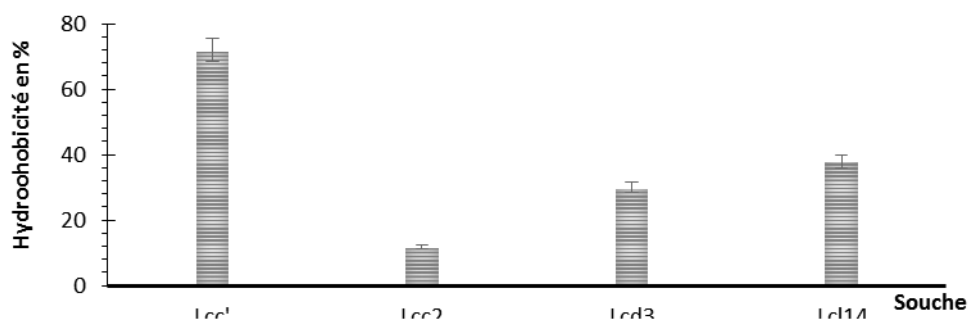


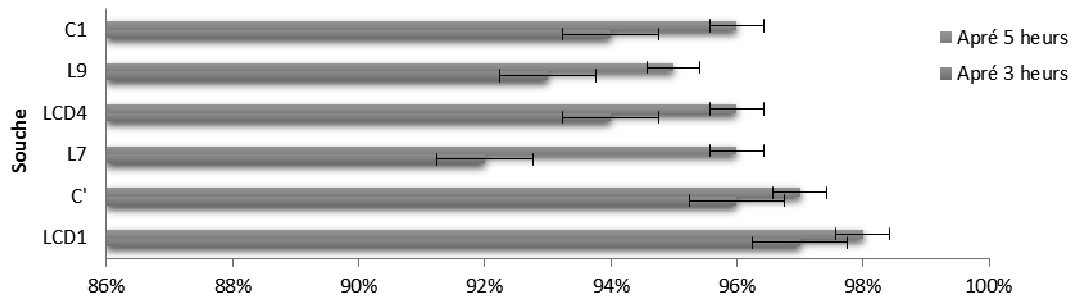
Figure 49 : Hydrophobicité des souches originaire du lait de brebis.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Chatain et *al.* (2010) qui ont trouvé une hydrophobicité de 40% pour des souches de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* et *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Tandis que *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* était plutôt hydrophile, avec une adhérence nulle au KNO_3 . L'hydrophobicité de plusieurs souches de *Lc. lactis* d'origine laitière a été évaluée par Giaouris et *al.* (2009). Ces derniers ont trouvé des valeurs qui oscillaient entre 5% et 88%. L'hydrophobicité de la paroi cellulaire est une propriété physico-chimique qui facilite le premier contact entre les microorganismes et les cellules hôtes. Ainsi, elle semble être un facteur aidant à l'adhérence, mais elle ne contribue pas à une bonne adhésion, (Roos et Jonsson ; 2002 ; Guglielmotti et *al.*, 2007). D'après les travaux de Guglielmotti et *al.* (2007), des espèces de *Lactobacillus* ont révélé une hydrophobicité qui varie entre 5% et 63%.

11.4.4- Auto agrégation et Coaggregation

L'autoaggrégation permet aux cellules de former un biofilm au niveau de la muqueuse intestinale et constituer ainsi une barrière contre l'implantation des bactéries pathogènes. Elle s'effectue entre les cellules de la même espèce ou du même genre. L'auto-agrégation est évaluée par le temps de sédimentation. Les isolats sont potentiellement probiotiques quand le pourcentage d'autoaggrégation est élevé et dépasse 50%. Les résultats obtenus montrent (figures 50 et 51) que chez les souches sélectionnées et pour des temps de contact de 3h et 5h

l'agglomération atteint un pourcentage compris entre 96 et 99% que ce soit en aérobiose (équivalent à la voie buccale) ou en anaérobiose (passage au niveau de tube digestive jusqu'à



l'intestin).

Figure 50 : Pourcentage d'auto agrégation en condition aérobie.

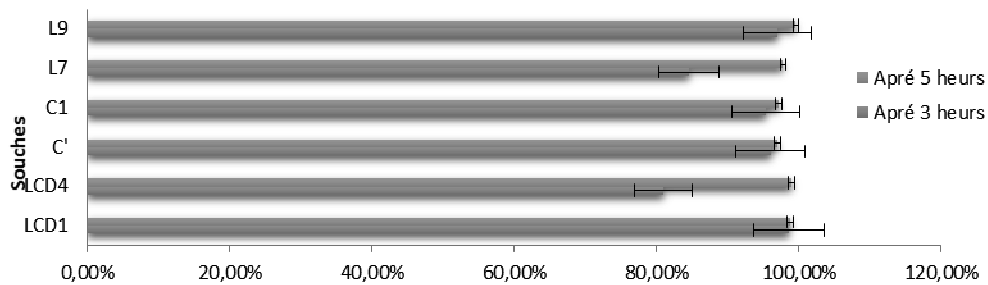


Figure 51 : Pourcentage d'auto agrégation en condition anaérobie.

11.4.5- La Coaggregation

La Coaggregation détermine le pouvoir des cellules de bactérie probiotique de se lier aux cellules de la bactérie pathogène afin que ces dernières ne peuvent pas se fixer sur leurs cibles au niveau des cellules épithéliales. Les isolats sont potentiellement probiotiques quand le pourcentage de co-agrégation est élevé en dépasse 50%. Nos résultats montrent que la co-agrégation des cellules des isolats sélectionnés en aérobiose présente un pourcentage élevé, de 90% à 93,85% respectivement chez *Lc. lactis* subsp. *Diacetylactis* LcD₃, LcD₁ et de 89,28% à

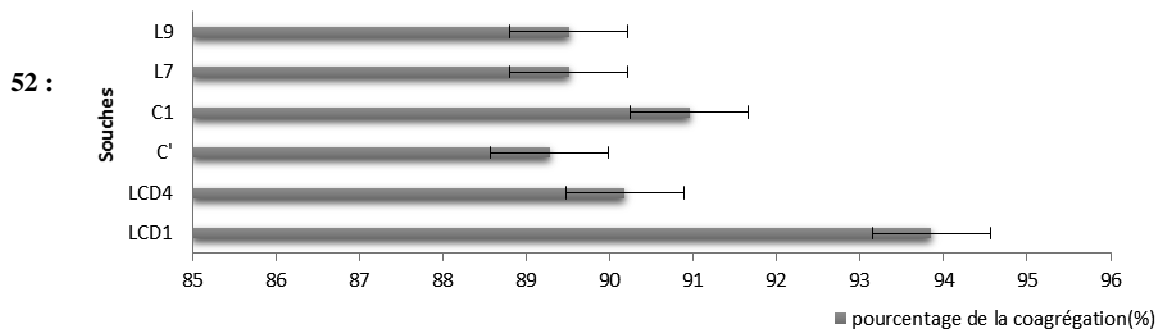


Figure 52 :

Coaggregation aérobie des souches testées.

90,95% chez *Lc. lactis* subsp. *Cremoris* (C'), Chez *Lc. lactis* subsp. *lactis* L7, L9 été de 89,51%. En anaérobiose les souches sélectionnés avait le même comportement et avec aussi un pourcentage de 87% à 90%.

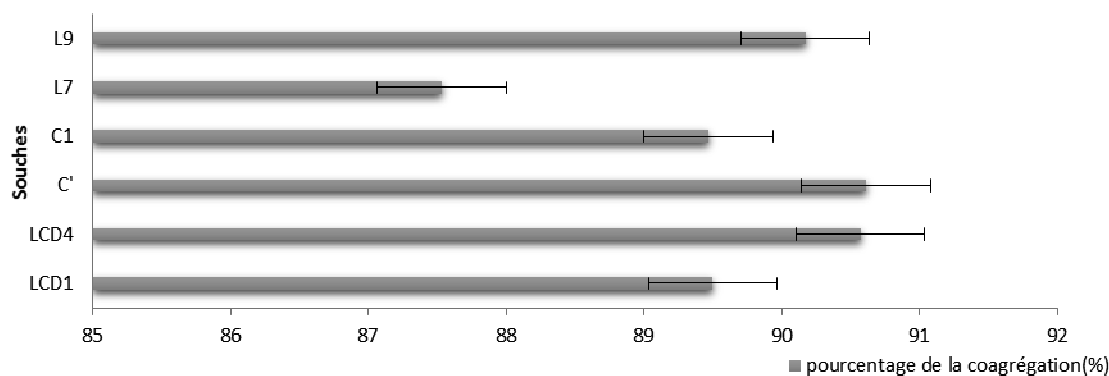


Figure 53 : Coaggregation en pourcent des souches en condition anaérobie

L'Adhésion cellulaire est un processus qui implique en plusieurs étapes un contact de la membrane à la cellule bactérienne et des interactions avec les surfaces. La capacité des bactéries probiotiques sous forme d'agrégats cellulaires est considérée comme une caractéristique souhaitable. Ils peuvent inhiber l'adhésion des bactéries pathogènes de la muqueuse intestinale soit en formant une barrière via l'auto-agrégation ou la Coaggregation avec les organismes commensal sur la muqueuse intestinale ou par Coaggregation directe avec les agents pathogènes pour faciliter le dégagement, (Bujnakova et *al.*, 2002 ; Schachsteik et *al.*, 2004). En outre, des études ont suggéré l'agrégation comme un mécanisme important d'échange génétique, l'adhérence et la colonisation dans les environnements hôte, ainsi que l'Immuno- modulation de la muqueuse colique (Cesena et *al.*, 2001 ; Voltan et *al.*, 2007). Selon Tomas et *al.*, (2007) ; Collado et Salminen (2007) ; Goh et Klaenhammer, (2010), l'autoaggregation augmente avec la concentration de glucose dans le milieu de croissance et du temps d'incubation. Ekmekci et *al.*, (2009) ont étudié la capacité de coaggregation avec *Escherichia coli* ATCC 11229 de 19 lactobacilles vaginaux. La Capacité de coaggregation a été positive dans des conditions aérobies (71 %) et dans des conditions anaérobies (62 %).

11.4.5 - Activité anti oxydante

La capacité anti radicalaire de surnageant des candidats probiotiques dans le bouillon MRS a été testé, les résultats trouvés sont illustrés par figure 54. Dans cet essai, la couleur jaune

de la solution d'essai change de nuance du vert au jaune en fonction de la réduction de la puissance de chaque échantillon antioxydant.

La Réduction de la puissance d'un composé a servi comme un indicateur important de son potentiel d'activité antioxydante. Le maximum d'activité antioxydante a été observé chez *Lactococcus lactis subsp cremoris*(C1) montrant 35,18 % suivie de *Lactococcus lactis subsp lactis biovar Diacetylactis* 4 (LCD₄) avec 32 % et *Lactococcus lactis subsp lactis* 9 (L9) avec 30,88%, *Lactococcus lactis subsp lactis* 7 (LcL₇) et *Lactococcus lactis subsp lactis biovar Diacetylactis*1 (LCD₁) ont généré une activité antioxydante de 29,52 et 28,65% et enfin *Lactococcus lactis subsp cremoris* (Lc.l C') 18,24%. Cette activité est moyenne en comparaison à l'étalon vitamine C (92,90 %).

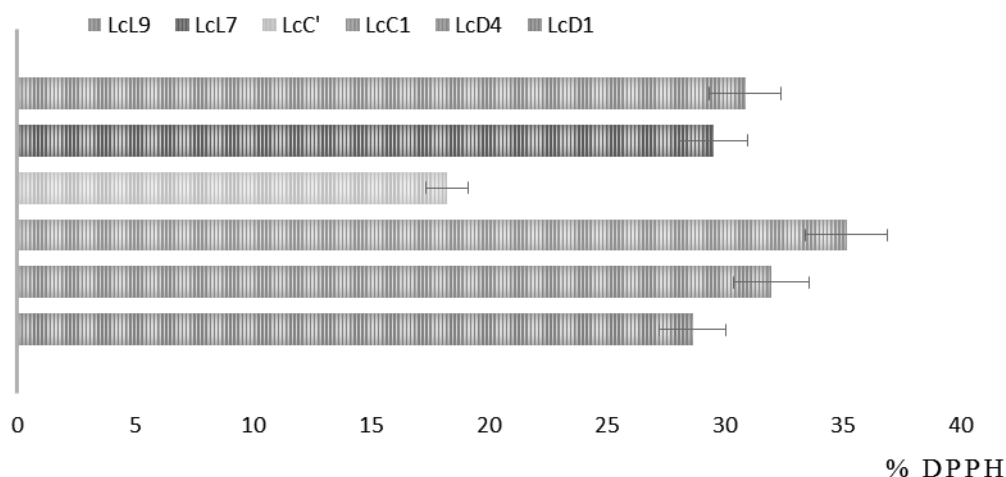


Figure 54 : Pourcentage de l'activité antioxydante des souches testées

Selon Abd El-Moneim Afify (2012) l'origine de cette activité est due soit au microorganisme lui-même soit à son activité (libérant des substances antioxydantes par hydrolyse de protéines ou de molécules conjuguées). Différentes études sur l'activité antioxydante de bactéries d'acide lactique ont démontré que certaines souches sont capables de diminuer le risque d'accumulation des radicaux libres et dégradants d'anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène Kaizu et al. (1993).

Lin et Yen (1999) sont les premiers à signaler l'activité antioxydante de *Lactobacillus sp* SBT 2028 ; et ont indiqué que l'extraits intracellulaire des cellules de *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 et de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ont une activité antioxydante. L'activité (16,45 % ± 1,06) était généralement dans la gamme observée pour les autres souches de *Lactobacillus*, (Shchepetova et al., 2006).

Cet aspect peut être d'un intérêt particulier, en tenant compte du fait que les souches probiotiques avec haute activité antioxydante pourrait non seulement contribuer à la lutte contre toutes les maladies liées aux ROS (Reactive Oxygen Species), mais peuvent également présenter, in vivo, une plus grande survie en particulier une niche écologique et, probablement aussi grâce à la production d'acides organiques, un haut rang d'anti-infectieux potentiel, comme il a été démontré par Hutt et *al.* (2006) et Truusalu et *al.* (2004) dans différents probiotiques. Ces données, avec nos constatations, suggèrent que l'activité DPPH radical piégeur est genre, souche- et dose dépendante, Dilek Kaya Ozdogan et *al.* (2012).

12 - Production biotechnologique de l'acide lactique

Une production biotechnologique de l'acide lactique L+ par utilisation d'un bioréacteur à lit fixe a été conduite. Les cellules de la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 sont naturellement adsorbées sur un garnissage de pouzzolane formant un biofilm. Le milieu de fermentation est du lactosérum doux déprotéiné à la concentration de 65g/l (correspondant à 45g/l de lactose) additionné de 5g/l d'extrait de levures et de 3g/l de $MgSO_4 \cdot 5H_2O$. L'étude cinétique comparative du comportement de la souche à l'état planctonique et immobilisée en mode batch et en continu nous a permis de tester les performances de ce système.

12.1 - Caractérisation du support

La pouzzolane de Beni-saf est constituée par des scories (projections) volcaniques fortement alvéolées (figure 55). De couleur noire (en proportion dominante) à grise en passant par le brun, en relation avec les degrés d'oxydation des oxydes de fer selon qu'il s'agit de magnétite Fe_2O_4 ou d'hématite Fe_2O_3 , la coloration est noire ou rouge.

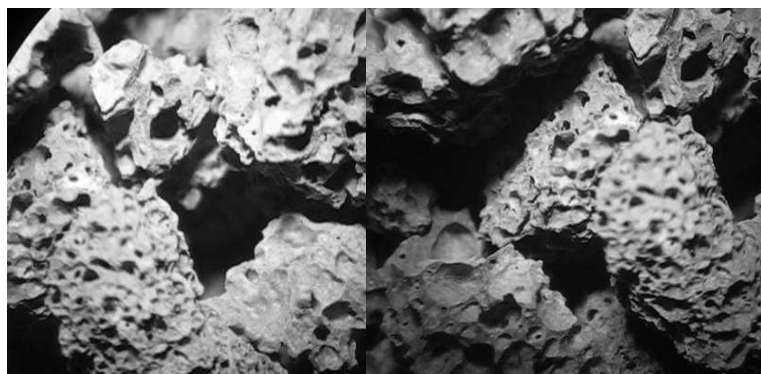


Figure 55 : Aspect alvéolaire de la pouzzolane sous loupe binoculaire (Grossissement X10)

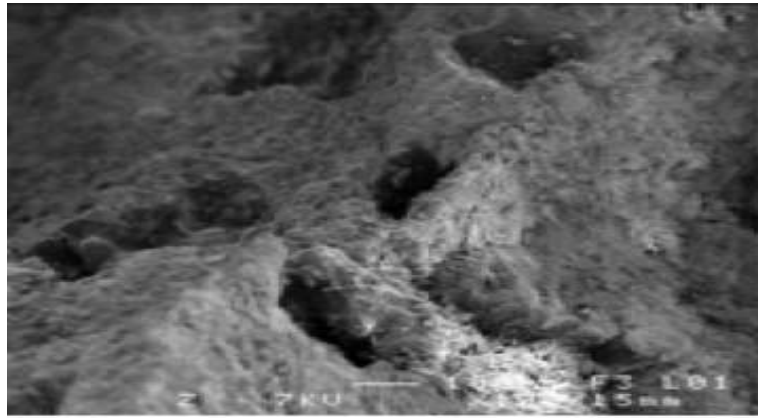


Figure 56 : Imagerie électronique de surface de la pouzzolane de Beni saf.

12.2-Minéralogie

Le dépouillement du diffractogramme (figure 56) révèle que parmi les minéraux décelés dans cette pouzzolane les aluminosilicates représentent plus de 80% du poids total avec la présence de cation divalents tel que Ca^{2+} et Mg^{2+} . Le profil montre respectivement la prévalence de la cordiérite ($2\text{MgO} \cdot 2\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{SiO}_2$) de l'analcime ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et enfin de faibles quantités d'hématite (Fe_2O_3) et de cristobalite (SiO_2).

Tableau 24 : Composition chimique centésimale de la pouzzolane de Beni-saf

SiO_2	Al_2O_3	Fe_2O_3	CaO	MgO	Na_2O	K_2O	S_0_3
56,48	17,83	8,92	9,51	4,34	3,0	1,40	0,17

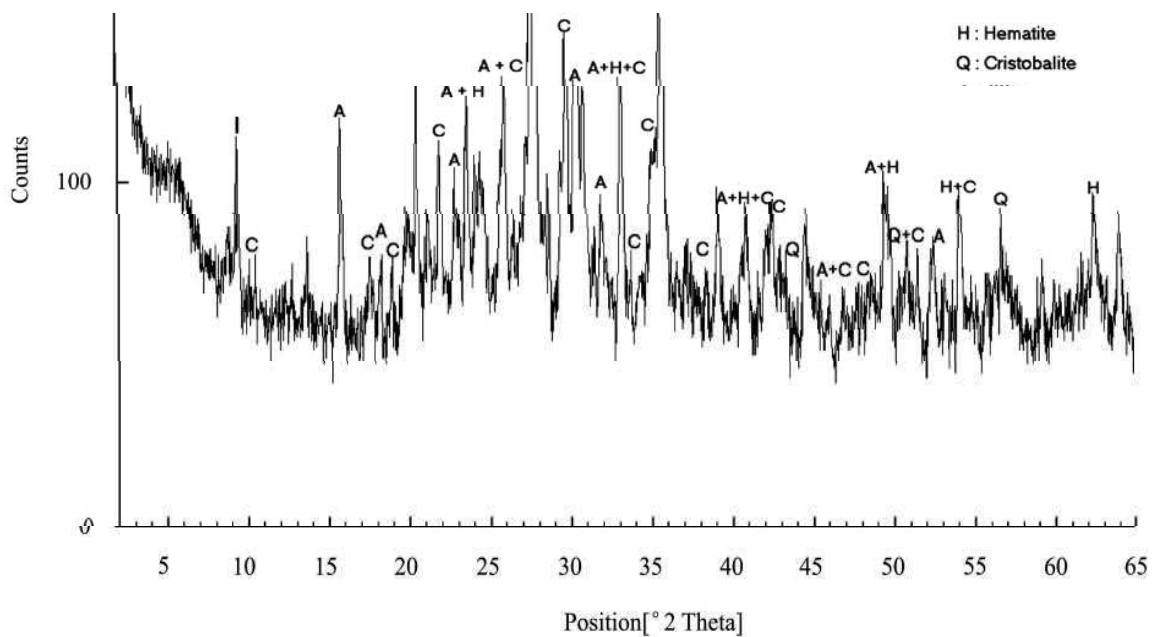


Figure 57 : Diffractogramme aux rayons X de la pouzzolane de Beni-saf (filtre Cu, $\text{K}\alpha$ radiation, Ni)

12.3-Propriétés physiques

Sous loupe binoculaire ainsi que par imagerie électronique de surface (figure 56) cette pouzzolane se présente sous forme de scories rugueuses et cendrées ayant des pores multiples de formes variées. Ce matériau léger de masse volumique de $0,98\text{g/cm}^3$, possède une surface spécifique appréciable de 3560 cm^2 par g et une porosité de 57% du poids total. Chimiquement inerte et neutre (conductivité électrique de $0,02\mu\text{s/cm}^2$ et pH compris entre 6,5 et 7). Lorsque le ratio SI/AL est supérieur à un (1) le matériau est considéré être hydrophobe. Dans notre cas, l'index SI/AL est de 2,7 indique un niveau d'hydrophobie prononcé. De plus, ce matériau est caractérisé par une résistance mécanique élevée.

Tableau 25 : Propriétés Physiques et physico-chimiques de la pouzzolane de Beni-saf

Caractéristiques et physico-chimiques		
Masse volumique apparente	g/cm^3	0,98
Masse volumique absolue	g/cm^3	2,75
Aire spécifique Blaine	cm^2/g	3560
Absorption d'eau	%	58,70
Porosité	%	57,10
Conductivité électrique Ce	$\mu\text{S/cm}^2$	0,02
pH	unité	6,5 – 7
Hydrophobicité index	SI /AL Ratio	2.7

12.4- Caractéristiques de la souche de *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9

L'aptitude à l'attachement, de cette souche est à la formation de biofilm a été évalué par la détermination de son comportement vis à vis de solvant apolaire et monopolaire et également ses propriétés acide-base de Lewis (caractère électro-donneur ou électro-accepteur). Les résultats trouvés sont consignés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Affinité de *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 pour les trois solvants utilisés dans la méthode MATS après culture sur Elliker et lactosérum enrichi à 30°C.

Solvant	Hexadecane	Chloroforme	acétate d'éthyle
Elliker	90 ± 5	6 ± 1	2 ± 1
LS	92 ± 6	8 ± 2	4 ± 1

Les résultats obtenus pour la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 après croissance de 24 heures à 30°C montrent qu'elle possède une affinité élevée pour l'Hexadecane (le solvant non polaire) révélant sa forte hydrophobie ($> 80\%$). La faible attraction envers l'acétate d'éthyle et le Chloroforme en comparaison au solvant non polaire révèle sa nature de

faible électron-accepteur ou électron-donateur. Le même comportement est remarqué dans les deux milieux de culture.

12.3- Cinétique d'immobilisation de la biomasse :

Dans une première phase nous avons déterminé la capacité de la souche à s'adsorber au support en fonction de différentes tailles granulométriques (1,25, 4 et 6,25mm). Pour cela une étude de croissance sur lactosérum enrichi (LS) en absence et en présence de pouzzolane a été conduite à 30°C et à pH initial de 6,5. La biomasse fixée a été mesurée par l'évolution de la matière sèche en cours du temps. Les résultats trouvés sont illustrés dans la figure 51.

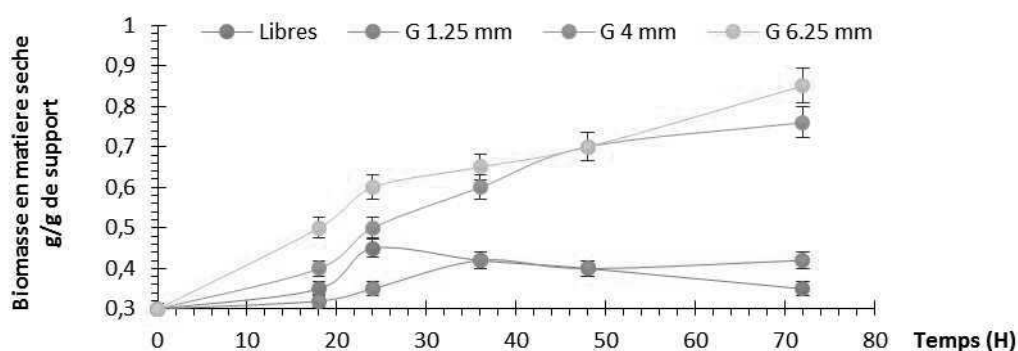


Figure 59 : Evolution de la biomasse cellulaire en présence et en absence de pouzzolane à 3% (p/v) de la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL9 cultivée sur lactosérum enrichi à 30°C et a pH initial de 6,5.

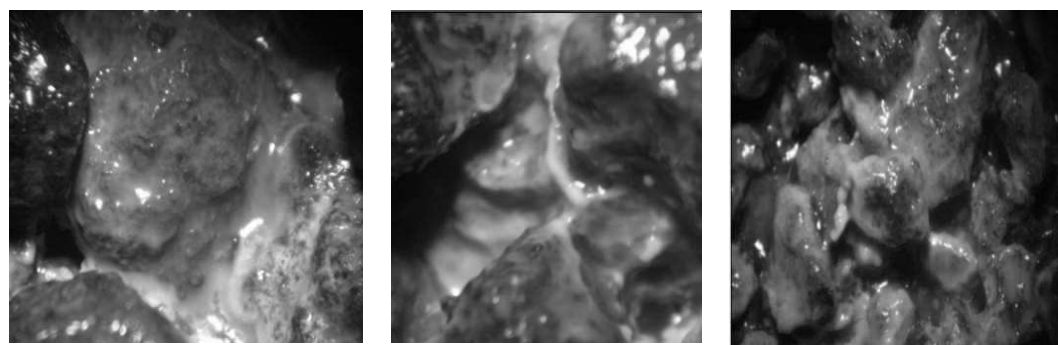


Figure 59 :
F
or
m
at

Granulométrie de 6.25 mm

Granulométrie de 4 mm

Granulométrie de 1.25 mm

ion du biofilm par *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉ sur les différentes granulométries de la pouzzolane (Observation sous loupe binoculaire).milieu LS après 24 heures de croissance à 30°C.

Les résultats montrent que dans le cas des cellules planctoniques la biomasse chute rapidement après 24 heures de croissance (atteignant la phase stationnaire) (figure 59). Par contre la biomasse fixée continue d'augmenter. Le niveau le plus élevé est enregistré avec la taille granulométrique de 6,25 mm La masse cellulaire adsorbée exprimée en grammes de poids sec par gramme de support est respectivement de $0,6 \pm 0,003$ avec 6,25 mm, $0,5 \pm 0,007$ avec

4mm et $0,35 \pm 0,0032$ avec 1,25 mm Ces données montrent clairement que la pouzzolane offre de bonnes conditions de développement et de maintenance d'une haute densité cellulaire. La production d'acide lactique par la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉ adsorbées au lit est également améliorée (figures 53 et 54). Elle est supérieure de 40% comparée aux cellules planctoniques. Le niveau de production le plus élevé est obtenu dans le cas de la granulométrie 6,25mm. Nous avons enregistré des augmentations dans la consommation du lactose qui sont les suivantes :

- 21% dans le lit de 1,25 mm
- 38% dans le lit de 4 mm
- 77% dans le lit de 6,25

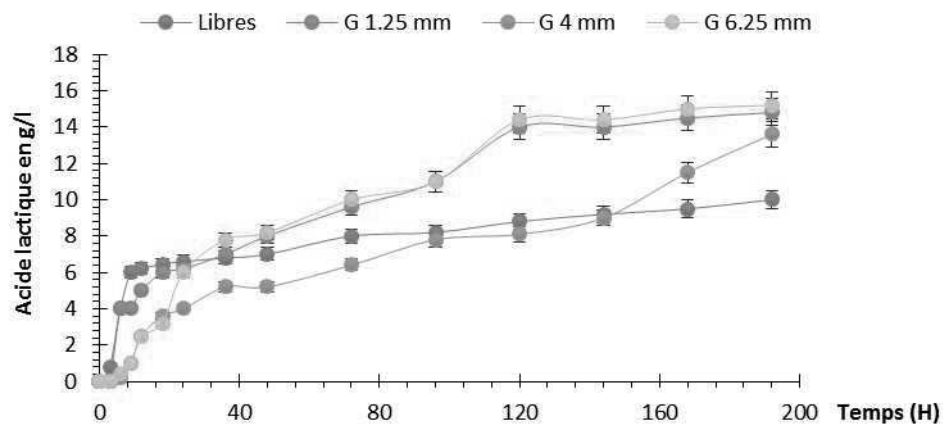


Figure 60 : Production d'acide lactique (g/l) par la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉ en conditions planctoniques immobilisées sur pouzzolane aux granulométries de 1,25, 4 et 6,25 mm cultivées à 30°C dans le milieu lactosérum supplémenté (LS).

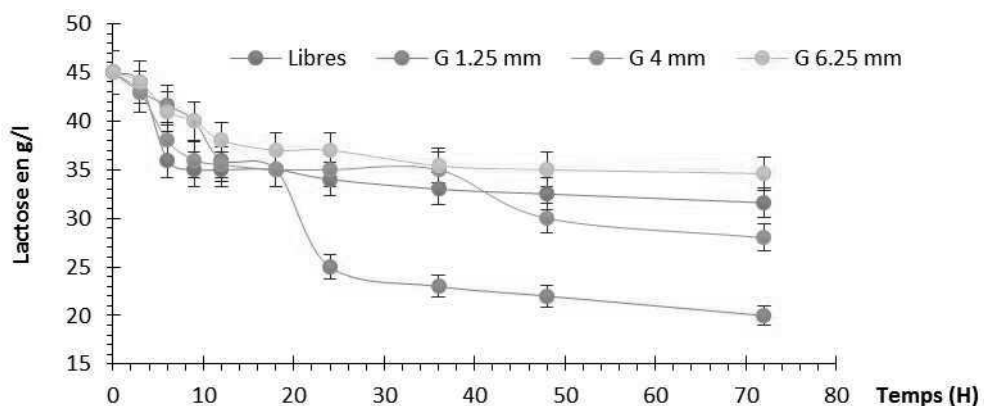


Figure 61 : Lactose résiduel (g/l) de la fermentation par les cellules planctoniques et les cellules immobilisées en culture batch de la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉ sur pouzzolane à différentes granulométries cultivées à 30°C dans le milieu LS.

12.4- Production en mode continu de l'acide lactique

Les expériences de fermentation en continu ont été menées afin d'évaluer le potentiel d'application industriel de ce système, le taux de conversion du substrat, le rendement en acide

lactique et les productivités pour un fonctionnement à long terme ont été mesurés. Le biofilm de *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉ a été développé sur les particules du support de 6,25 mm de diamètre est alimenté par le milieu LS en continu. Quatre taux de dilutions ont été testés 0,21, 0,26, 0,31, 0,36, 0,41 et 0,46 h⁻¹. Les Figure 60,61,62 et 63 montrent les résultats des opérations pour une période dépassant les vingt jours. Nous remarquons que pour l'ensemble des taux de dilution les allures des courbes sont similaires avec des niveaux de transformation appréciables. Dans tous les cas le régime stationnaire est atteint après douze jours de fonctionnement avec un rythme stable et entretenu. En générale toutes les options testées sont appropriées pour l'obtention des productivités élevées en acide lactique pour des durées supérieures à 12 jours. Le taux de conversion du lactose est compris entre 88,88 à 94,75%, le rendement en acide lactique varie de 10,26 ± 0,45 à 21,80 ± 0,34 et les productivités entre 14,36 ± 0,33 à 30,57± 0,32 g.l⁻¹.h⁻¹ pour les taux de dilution (D) respectifs de 0.21h⁻¹ à 0.46h⁻¹. la meilleur efficience en acide lactique est enregistré à D = 0,46 h⁻¹. Le comportement de la souche révèle que dans les conditions de pH non contrôlé à des taux de dilution élevés la production de l'acide lactique est découplée de la croissance.

De plus nous observons que plus D est élevé plus la biomasse fixée est faible. En régime stationnaire le plus haut niveau de biomasse est atteint à 0, 21h⁻¹ (plus de 2,5 g par g de support) et le plus faible est atteint à 0,46h⁻¹ (moins de 0,5 g/g de support).

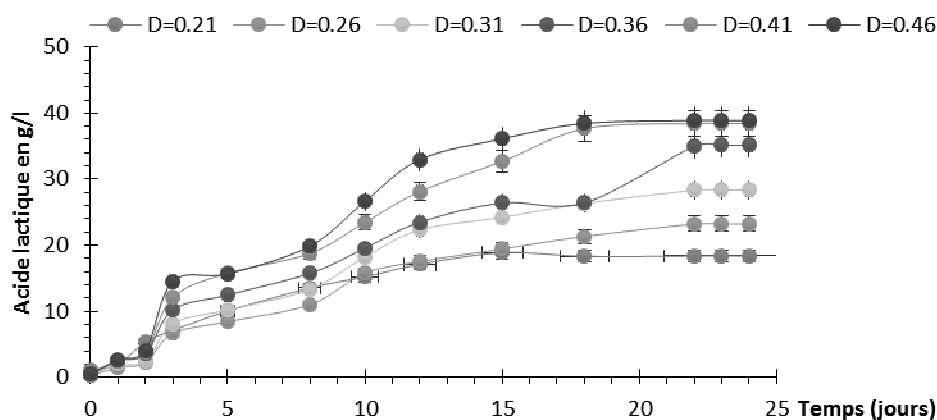


Figure 62 : Teneur en acide lactique (g/l) en fonction du taux de dilution et du temps à 30°C

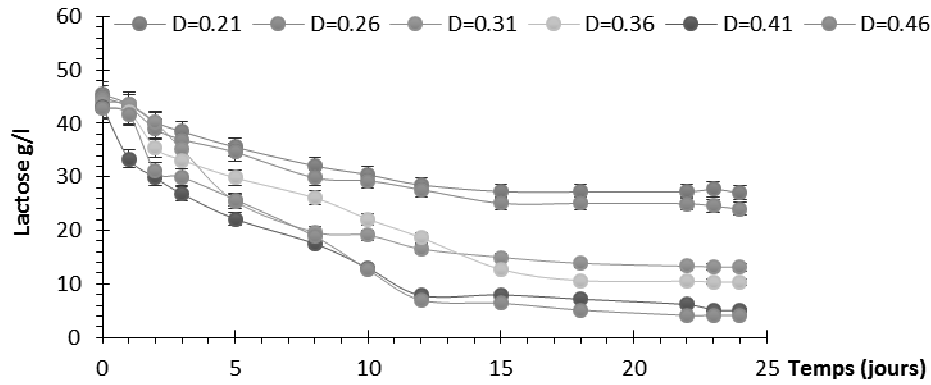


Figure 63 : Lactose résiduel en fonction des taux de dilution et du temps de fermentation.

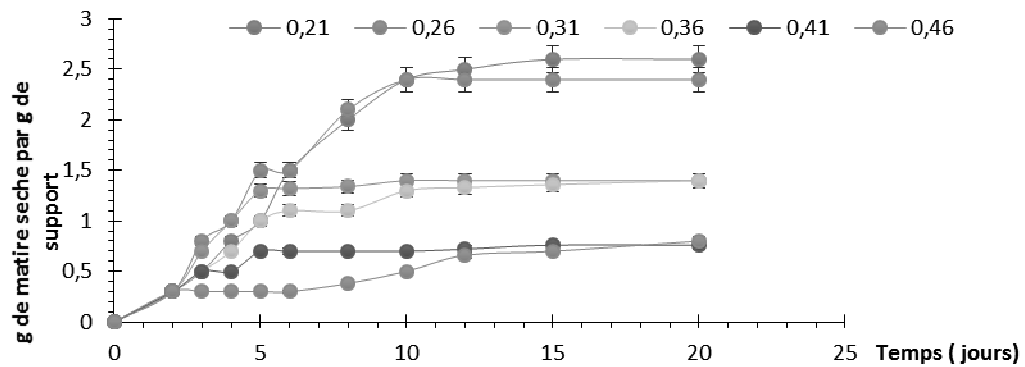


Figure 64 : Evolution de la matière sèche (g/g de support) de la biomasse cellulaire en fonction des taux de dilution et du temps à 30°C.

Dans le tableau 27 sont repris les résultats les plus pertinents obtenus lors de la fermentation en continue par la souche *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉. L'analyse statistique révèle une corrélation hautement significative entre le taux de dilution D, la production et la productivité en acide lactique ($0,99 \leq R^2 \leq 1$). La souche est stable sous toutes les contraintes appliquées dans ce système. Les niveaux de production de l'acide lactique sont importants pour l'ensemble des conditions de conduite envisagées.

Tableau 27 : Récapitulatif de la production d'acide lactique, du lactose résiduel de la conversion et de la productivité aux différents taux de dilution D.

Taux de dilution D (h ⁻¹)	Acide lactique g/l	Lactose résiduel g/l	Conversion %	Productivité g.l ⁻¹ .h ⁻¹
0,21	10,26 ± 0,45	2,36 ± 0,11	94,75	14,36 ± 0,09
0,26	12,72 ± 0,56	2,93 ± 0,10	93,49	17,81 ± 0,11
0,31	15,16 ± 0,20	3,48 ± 0,20	92,26	21,22 ± 0,12
0,36	17,6 ± 0,13	4,11 ± 0,11	90,88	22,71 ± 0,12
0,41	19,48 ± 0,61	4,80 ± 0,14	89,33	27,32 ± 0,15
0,46	21,8 ± 0,32	5,00 ± 0,10	88,88	30,57 ± 0,20

13 - Discussions

La caractérisation minéralogique, physico-chimique et physique de la pouzzolane de Beni-saf révèle les aptitudes de ce matériau à des applications en procédés de fermentation. Forte

inertie chimique et surface spécifique élevée, rugueuse et à caractère hydrophobe, de structure alvéolaire et fermée favorable au comportement anoxique du microorganisme. Dans la première phase d'adhésion de la bactérie aux supports, certains auteurs mettent en premier rôle la charge à la surface qui peut engendrer les forces électrostatiques d'attraction ou de répulsion lors de l'approche du microorganisme. En effet, les cellules bactériennes de charges négatives et dont le nombre est variables en fonction de la souche et les cations divalents du support minéral tel que le Ca^{2+} et le Mg^{2+} , à l'origine de charges positives ponctuelles superficielles, entraînent l'établissement de ponts ioniques d'attraction (Corpe, 1970). Chez les aluminosilicates ce pouvoir de fixation est aussi attribué à l'ensemble des groupements silanol ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) et leur localisation à la surface du matériau (Jesionowski, 2001). La mesure de l'hydrophobicité/hydrophilie de la surface des cellules est considérée comme indicateur de la capacité de celle-ci à l'adhésion aux surfaces des solides et des interfaces. Cette propriété est étudiée pour comprendre la première étape d'adhésion de la bactérie qui est la cause dans la formation du biofilm (Donlan, 2002 ; Strevett et Chen, 2003). La surface des souches de bactéries lactiques étudiées dans la littérature est plutôt hydrophile (Boonaert et Rouxhet, 2000 ; Pelletier et *al.*, 1997).

Par ailleurs, beaucoup de travaux récents trouvent que ce caractère est variable est souche dépendant. Certains probiotiques de *Lb. plantarum* présentent un caractère hydrophobe avec un coefficient de partition entre l'Hexadecane et l'eau supérieure à 50% et d'autres plutôt hydrophiles (Naima, 2010). D'autres souches présentent une hydrophobie moyenne avec un pourcentage d'affinité pour l'Hexadecane de 38%. Notre souche présente un pourcentage d'affinité supérieure envers l'Hexadecane, l'hydrophobicité de plusieurs souches de *Lc. lactis* d'origine laitière a été évalué par Giaouris et *al.* (2009) et qui rapportent des valeurs qui oscillaient entre 5% et 88%. De plus Ly-Chatain et *al.* (2010) mentionnent quant à eux des niveaux d'hydrophobicité de 40% pour des souches de *Lc. lactis subsp. lactis biovar. Diacetylactis*.

Une étude conduite par Iyer et *al.* (2010) a montré que l'hydrophobicité de deux streptocoques était de 20 et 24%. D'après les travaux de Guglielmotti et *al.* (2007), des espèces de *Lactobacillus* ont révélé une hydrophobicité qui varie entre 5% et 63%. Par ailleurs, dans une autre étude réalisée par Pan et *al.* (2006), l'hydrophobicité de vingt-trois souches de *Bifidobacterium* était comprise entre 32% et 37%. Les souches, possédant une forte hydrophobie de surface, présentent en général une capacité d'adhésion meilleure. Les auteurs concluent aussi sur le fait que l'hydrophobie de surface peut être utile à l'adhésion, mais ce n'est manifestement pas le seul prérequis et/ou facteur nécessaire qui intervient dans le processus

d'adhésion bactérienne. En effet, l'hydrophobie de surface est l'une des propriétés physico-chimiques qui facilitent le premier contact entre le micro-organisme et le support.

Elle est impliquée dans la phase initiale d'adhésion non-spécifique qui permet le rapprochement des bactéries de leurs cibles, qui laisse place à la 2ème étape d'adhésion spécifique, faisant intervenir des entités moléculaires protéiques et/ou non protéiques ancrées au niveau de la paroi bactérienne (Granato et *al.*, 1999; Rojas et *al.*, 2002 ; Roos et Jonsson, 2002). D'autres études antérieures étayant également l'absence de corrélation directe entre l'hydrophobie et la capacité d'adhésion (Wadström et *al.*, 1987 ; Vinderola et *al.*, 2004). Plusieurs études ont investi la composition, la structure et les forces impliqués chez la bactérie et les résultats confirment que l'index d'hydrophobicité pourrait dépendre de la source de carbone utilisée comme substrat. Le pourcentage hydrophobique le plus élevé démontre que ce microorganisme présente d'importantes caractéristiques superficielles, impliquant le contact entre la membrane cellulaire de la bactérie et la surface inter-reagissante. Selon ces auteurs les groupements chimiques des protéines, polysaccharides, peptidoglycanes et acides lipoteichoïques à la surface cellulaire sont responsables de ces propriétés physico-chimiques.

La charge bactérienne résulte de la dissociation ou de la protonation de groupements ionisables majeurs, les groupements phosphates des acides lipoteichoïques et des régions carboxyliques d'acides aminés des protéines, qui dépendent du pH. Cette différence dans l'affinité est due aux interactions acides-bases de Lewis entre le microorganisme et les hydrocarbures (Ly et *al.*, 2008). En fait, la capacité de rétention de la biomasse est linéairement corrélée au degré d'hydrophobicité de la surface du microorganisme (Pereira et *al.*, 2000 ; Oliveira et *al.*, 2001).

Par ailleurs beaucoup d'études montrent que la surface hydrophobe du support minéral est plus importante pour la colonisation par le consortium bactérien anaérobie que la charge de surface. La charge de surface du matériau peut être modifiée par le pH et la composition ionique de la solution environnante.

Actuellement, l'aire de la surface spécifique du support est recherchée pour promouvoir la croissance biologique permettant un taux de transfert maximum et un piégeage des solides en suspension favorisant une concentration élevée en biomasse attachée et par conséquent la mise en œuvre de réacteur de dimension réduite (Oliveira et *al.*, 2001). Par ailleurs la charge de surface peut aussi être modifiée par l'adsorption de protéines, qui a lieu au cours des premières étapes de l'adhésion. Cette adsorption augmente avec l'hydrophobicité du support (Nath et *al.*, 2004; Pamula et *al.*, 2004 ; Lerebour et *al.*, 2004).

Les forces absorbatives sont d'autant plus fortes que le diamètre pore est faible et la dimension du pore est élevée. Tandis que les interactions moléculaires présentent des effets de plus en plus prononcés sur le processus d'adhérence. Le type de porosité ainsi que la distribution pore reflètent le type et les propriétés de l'adsorbant (Jaroniec, 1999). Le nombre de cellules immobilisées dépend du type de support. Leur pourcentage de relargage augmente avec l'augmentation du diamètre de ces particules. Plus la surface spécifique est élevée et plus la capacité d'immobilisation est élevée (Harendranath et al., 1996 ; Degaard et al., 2000).

Les cellules adsorbées sont en contact direct avec le milieu environnant et donc soumises à des forces de cisaillement ou d'attrition qui peuvent résulter de mouvements relatif des particules et du fluide. Il est donc probable que certaines cellules vont se détacher et entrer dans la phase de fluide en vrac. Il est également difficile de contrôler ou même de déterminer la profondeur du biofilm attaché. Par ailleurs, il est rapporté que dans les réacteurs à haute densité cellulaire lorsque la population maximale a été atteinte, le découplage entre la croissance et la production d'acide lactique est possible. L'amélioration dans la production d'acide lactique sous condition d'immobilisation peut être attribuée aussi à une meilleure activité tampon du milieu de fermentation. Les données comparatives sur les rendements de conversion et les concentrations résiduelles du lactose révèlent qu'il n'y a aucune différence notable entre les taux de dilution D utilisés.

La figure 56 montre que durant le processus de fermentation, La concentration en lactose baisse progressivement et rapidement durant la phase transitoire et que pendant le régime stationnaire le lactose est presque totalement consommé (concentrations résiduelles sortantes du lactose toujours inférieures à 5g/l).

Cependant nous enregistrons des différences remarquables dans la productivité volumétrique des fermentations en fonction du taux de dilution. Les cellules naturellement adsorbées sur pouzzolane comparées à leur état planctonique produisent plus d'acide lactique et utilisent mieux le lactose. En régime stationnaire et en mode continu elles sont encore plus efficaces. Le taux de conversion du lactose frôle le niveau théorique de 90% avec une productivité record de $30\text{g l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Les travaux de Namura et al. (1987) dans ce domaine rapportent qu'une concentration maximale d'acide lactique de 60g l^{-1} a été obtenu par *Lb. casei* piégé dans de l'alginate de Baryum après 96 h de fermentation et que 80 g l^{-1} a été obtenu par *Lactobacillus delbrueckii* piégé dans des billes d'alginates de calcium au bout de 120 h de fermentation, tandis que Roukas et Kotzekidou (1990) ont rapporté $41,3\text{ g l}^{-1}$ d'acide lactique avec la co-immobilisation de *Lb. casei* et *Lb lactis* après 48 h de fermentation. Yoo et al. (1996) ont rapporté que la plus forte concentration d'acide lactique ($98,1\text{g l}^{-1}$) a été obtenue

par *Lb. casei* piégé dans des billes d'alginate de baryum après un temps de fermentation du glucose de 32 h.

Ces résultats sont rarement signalés dans la littérature. Certains auteurs tel que Amrane et Prigent (1997) ; Kulozik et Wilde (1999) qui ont travaillé sur *Lactobacillus bulgaricus* cultivée sur lactosérum enrichi concluent qu'à des pH bas, l'acide lactique provoque une pression dans les cellules microbiennes suite à cela elles perdent leurs activités physiologiques entraînant ainsi une inhibition de la β galactosidase et d'autres enzymes de la glycolyse.

Malgré cette pression acide les cellules immobilisées de *Lactococcus lactis subsp lactis* LcL₉ continuent de produire l'acide lactique à la même cadence sans aucune perturbation notable. Plusieurs études ont montré que, les cellules produites par la technologie des cellules immobilisées présentent un changement dans les caractéristiques de croissance, la morphologie et la physiologie comparées à celles issues de cultures planctoniques classiques. Les différences dans la physiologie de *Lactococcus lactis subsp. lactis* en condition de pH non-contrôlé sont dépendante du mode de conduite, batch ou continu, libres ou immobilisées (Doleyres, 2003). De plus, les états redox, le pool enzymatique et le pH intracellulaire l'expression génétique sont différents entre cultures cellulaires planctoniques et immobilisées (Cachon et al., 1998).

Des observations similaires ont été signalée par Roukas et Kotzekidou (1998) sur la production d'acide lactique à partir de lactosérum en culture pure et mixte de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Ils rapportent que les productivités sont respectivement de 0,375 et 0,425 $gl^{-1}.h^{-1}$ pour les fermentations conventionnelles en état libre des cellules et que sous forme immobilisées des augmentations allant de 13 à 68% sont remarquées en fonction du support. En effet le catalyseur doit être stable dans les conditions de son immobilisation.

Les propriétés mécaniques du support, spécialement la résistance au tassement, à l'érosion, la forme physique, et la résistance chimique, sont également importants. Ces propriétés déterminent la facilité avec laquelle les cellules devant être immobilisées. Parmi les différentes méthodes d'immobilisation des cellule le piégeage dans des billes d'alginate de calcium a été utilisé couramment pour l'immobilisation de cellules de bactéries en vue de la production d'acide lactique (Wang et al., 1995). Cependant les gels d'alginate de calcium sont chimiquement instables au contact avec divers agents chélateurs de cations tels que le phosphate, citrate et lactate qui peuvent causer une désorganisation des mailles du réseau et provoquer sa dissolution. Il a été rapporté également que des billes d'alginate de baryum sont chimiquement et physiquement plus stable dans des solutions d'électrolytes que les billes d'alginate de calcium classiques (Lee et al., 1993).

14- Détection de l'activité antimicrobienne

Les résultats trouvés révèlent que les souches cibles *Micrococcus luteus* et *Listeria innocua* sont très sensibles au surnageant de la culture *Lactococcus lactis subsp cremoris*. Le diamètre d'inhibition est fortement dépendant du milieu de culture utilisé. Les valeurs reportées dans le tableau 28 sont celles trouvées à l'encontre de *listeria innocua* ATCC 51742.

Tableau 28 : Influence du milieu de culture sur l'activité anti-*listeria* de *Lactococcus lactis subsp cremoris*

Milieux	Inhibition en mm	pH 24 heures	Titre en UA/ml	Inhibition de <i>listeria innocua</i> ATCC 51742
Synthétiques (bouillons) :	-	5,8	ND	
- MRS	-	6,2	ND	
- M17	13	4,5	250	
- Elliker				
Naturels (liquides) :				
- Lait	7	4,8	200	
- Lactosérum doux	17	4,6	3600	
- Jus de dattes (variété Ghars)	21	4,25	2500	

Le faible titre de la bactériocine enregistré dans le cas du lait comparé au lactosérum et au jus de dattes semble être lié à la difficulté d'extraction de la molécule qui apparemment reste adsorbée à ses composants notamment les caséines. Le lactosérum et le jus de dattes semble exhorter la souche dans la production de la bactériocine.

14.1- Propriétés physicochimiques de la bactériocine

14.1.1- Sensibilité aux enzymes

Tableau 29 : Sensibilité de la bactériocine aux enzymes.

Enzyme	Diamètre d'inhibition (n)	Enzyme	Diamètre d'inhibition (n)
Catalase	13	Protéinase K	0
Lysozyme	13	Lipase	13
Pepsine	3	Amylase	13
Trypsine	0	Pronase	0
α chymotryps	0	surnageant	13

La sensibilité envers les enzymes est très utile dans la caractérisation de la bactériocine. En effet l'examen du tableau 29 montre clairement que l'inhibition n'est pas l'activité de cette due à la production du peroxyde d'hydrogène parce que la catalase n'a pas d'incidence sur l'activité de la bactériocine. Par contre sa sensibilité à la protéinase K, la Prônasse, la Trypsine et l'alpha chymotrypsine ainsi que la Pepsine confirme sa nature protéique. Sa relative résistance à la pepsine est un indice de son poids moléculaire élevé. Insensible à l'amylase et à la lipase. Ajouté à cela son action inhibitrice est améliorée en présence d'agents tensio-actifs tels que le triton X100, le triton X 114 et le tween 80, sa diffusion est meilleurs sur milieu gélosé.

14.1.2-Effet de la température et du pH

La figure ci-dessous présente les résultats du traitement thermique et du pH sur le surnageant de culture de 24heures de la souche C'

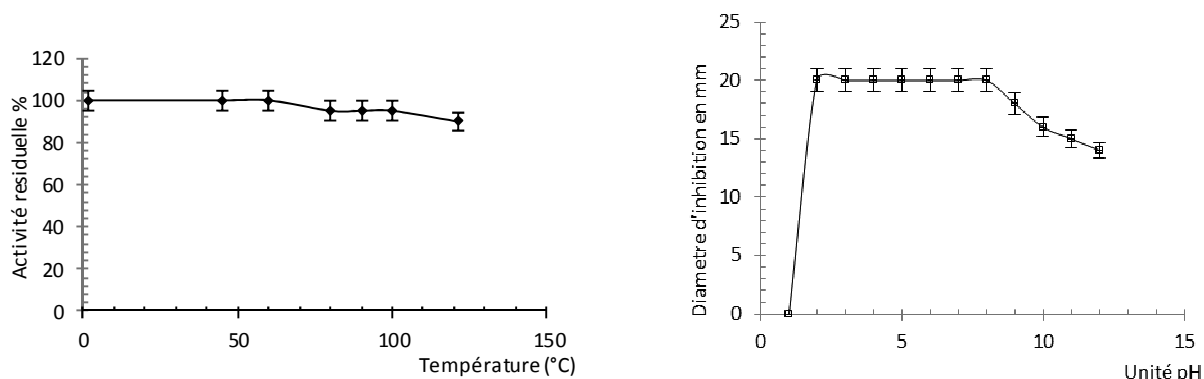


Figure 65 : Influence de la température et du pH sur l'activité de la bactériocine.

La figure 65 montre que la bactériocine est active de pH 2 à 12. Le maximum d'inhibition est enregistré de pH 3 à 9. De plus elle est très thermostable même à l'autoclavage ou la perte d'activité n'est que de 10%.

Tableau 30 : Effet des solvants sur l'activité de la bactériocine

Solvant	zone d'inhibition témoin n		zone d'inhibition Essai mm	
	10%	25%	10%	25%
Ethanol	0	0	8	5
Acétone	0	0	6	5
Hexane	0	0	6	5
Isopropanol	0	0	6	5
Toluène	0	0	3	5
Méthanol	0	0	9	5
Acétonitrile	5	8	9	9
Chloroforme	0	0	3	3
Surnageant	13			

Tableau 31 : Effet des agents tensioactifs

Agent tensioactif	zone d'inhibition témoin	zone d'inhibition Essai (mm)
Triton X100 1%	6	13
Triton X114 1%	0	15
Tween 80 1%	0	15
SDS 1%	13	13
Urée 1M	0	13
Surnageant	13	13

Tableau 32 : Effet des sels et Agents chélatants.

Agent Chélatants	Zone d'inhibition témoin (mm)	Zone d'inhibition Essai (mm)
CaCl2 1M	0	0
ZnCl2 1M	0	23
MgCl2 1M	0	0
MgSO4 1M	0	0
NaCl 1M	0	13
EDTA 0,4 M	13	23
Surnageant	13	13

14.3- Essai d'extraction et de purification de la bactériocine

14.3.1- Précipitation au sulfate d'ammonium

Différentes concentrations en sulfates d'ammonium ont été ajoutées au surnageant de 24 heures de la culture C' dans le bouillon Elliker centrifugé a 10 000rpm/10 minutes/4°C.

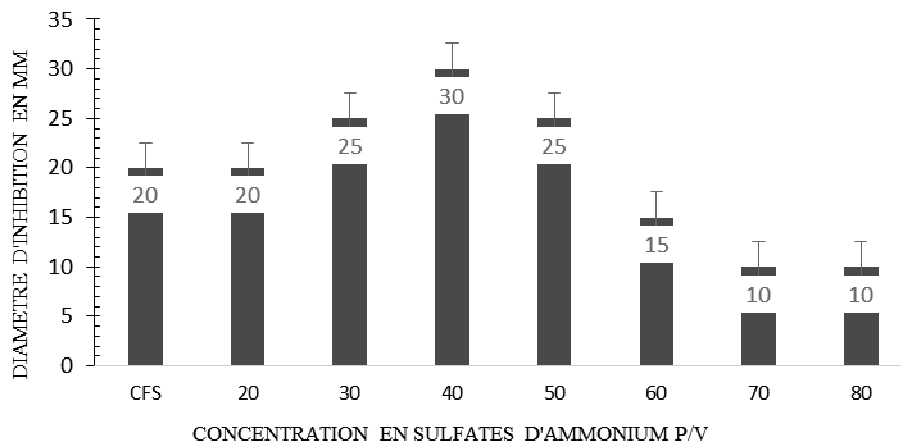


Figure 66 : Influence de la concentration en sulfate d'ammonium sur l'extraction de la bactériocine.

A la saturation de 40% de sulfate d'ammonium au surnageant de la culture de *listeria innocua* (bouillon Elliker/30°C) nous avons obtenu une activité maximale d'inhibition correspondant à 30 mm de diamètre. Cette concentration permet de concentrer suffisamment la bactériocine sans modification apparente de son activité.

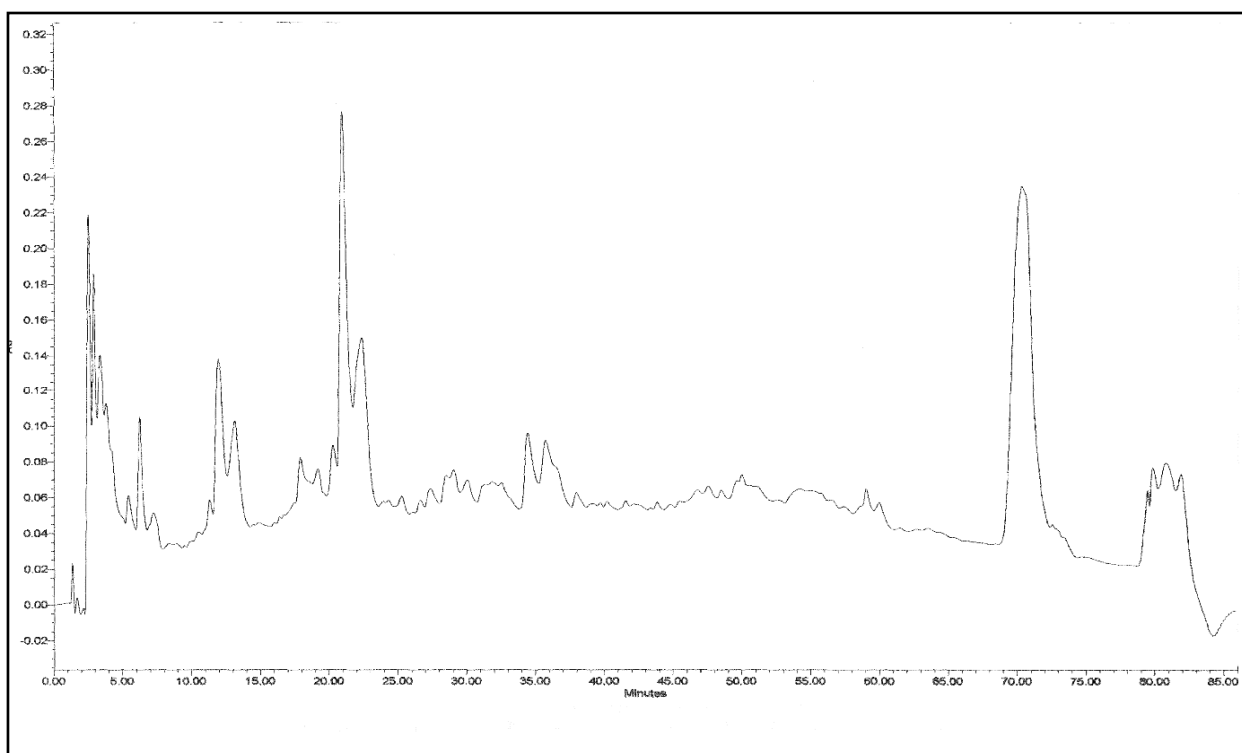


Figure 67 : Chromatogramme RP – HPLC du surnageant Elliker

14.3.2- Précipitation aux solvants

L'acétone, l'éthanol ainsi que le chloroforme ont été testés. Les résultats obtenus sont repris dans le tableau ci-dessous

Tableau 33 : Effet des solvants sur l'activité de la bactériocine (diamètre en mm)

Solvant d'extraction	Diamètre d'inhibition	Titre en UA/ml
Témoin (surnageant)	20	250
Acétone	0	0
Ethanol	0	0
Chloroforme	30	300

La figure 67 montre que les profils des chromatogrammes des deux méthodes de précipitation au chloroforme et au sulfate d'ammonium sont quasi identiques. Le pic actif (correspondant à la bactériocine) est plus prononcé dans le cas de la précipitation au chloroforme indiquant une concentration plus élevée que celle au sulfate d'ammonium.

Les résultats de la présente étude concernant la purification de la bactériocine ont montré que la concentration par précipitation au sulfate d'ammonium n'est pas une étape de concentration appropriée pour cette purification. En effet elle ne semble pas être en mesure de précipiter la bactériocine d'une façon efficace. Par ailleurs, il a été démontré que les fractions précipitées au sulfate d'ammonium subissent une perte significative d'activité. D'où la nécessité

d'initier la purification à partir du surnageant brut actif. Les travaux de Lachance (2000) démontrent que la bactériocine possède un poids moléculaire se situant entre 3,5 kDa et 14 kDa.

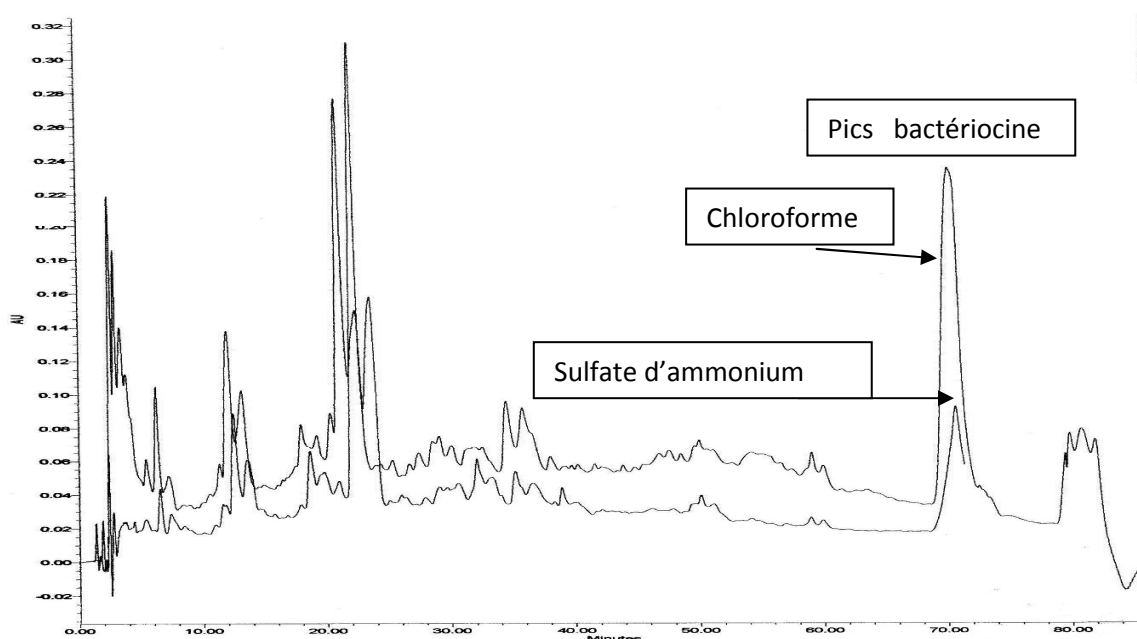


Figure 68 : Chromatogrammes : RP-HPLC précipitation au chloroforme et au sulfate d'ammonium.

Suite à la filtration du surnageant sur une membrane de 30 kDa, aucune activité n'est retrouvée dans le filtrat. La présence d'activité dans le retentât vient donc conforter l'hypothèse d'agrégation ou de l'adsorption sur les membranes de filtration. La centrifugation à 10 000g pourrait ainsi être responsable de la désagrégation de la bactériocine. De telles observations ont déjà été rapportées lors de la purification de la bactériocine de classe II et III (Toba et *al.*, 1991; Thompson et *al.*, 1996). En effet, il a été signalé que le poids moléculaire estimé de certaines bactériocines excédait 200 kDa alors qu'après purification, il était beaucoup plus bas.

14.3.3- Extraction par échange ionique

L'extraction à partir du surnageant par échange ionique sur résine hydrophobe XAD4 a permis l'obtention d'un concentrât brute actif de diamètre d'inhibition de 30 mm titrant 350 UA/ml en bactériocine. L'étape de purification par FPLC sur colonne SP sepharose n'a pas abouti. Le chromatogramme obtenu à une forme indéfinie signe d'une difficile séparation.

14.3.3- Adsorption-désorption

Cette méthode semble la plus appropriée à notre cas. En effet les résultats trouvés révèlent qu'en une seule étape la bactériocine a été extraite et purifiée. Le titre obtenu est de 500 UA/ml. L'injection de l'extrait en RP HPLC montre l'existence d'un seul pic actif.

15- Caractérisation moléculaire de la bactériocine

La bactériocine purifiée présente un poids moléculaire de 24 KDA. Elle est polychargée (au total 27 charges dont 7 sont négatives et le reste des charges positives)

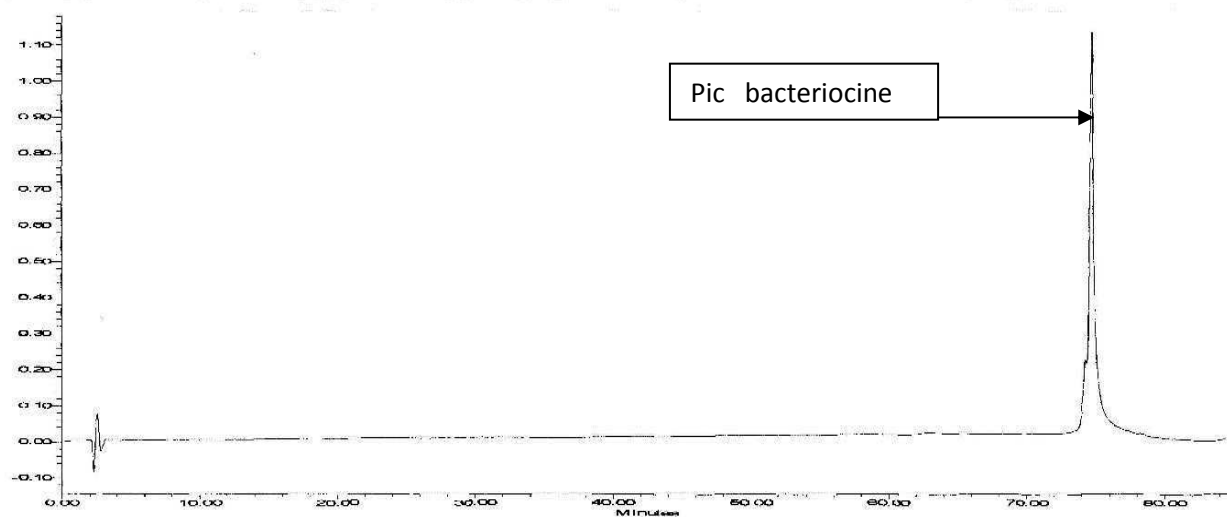
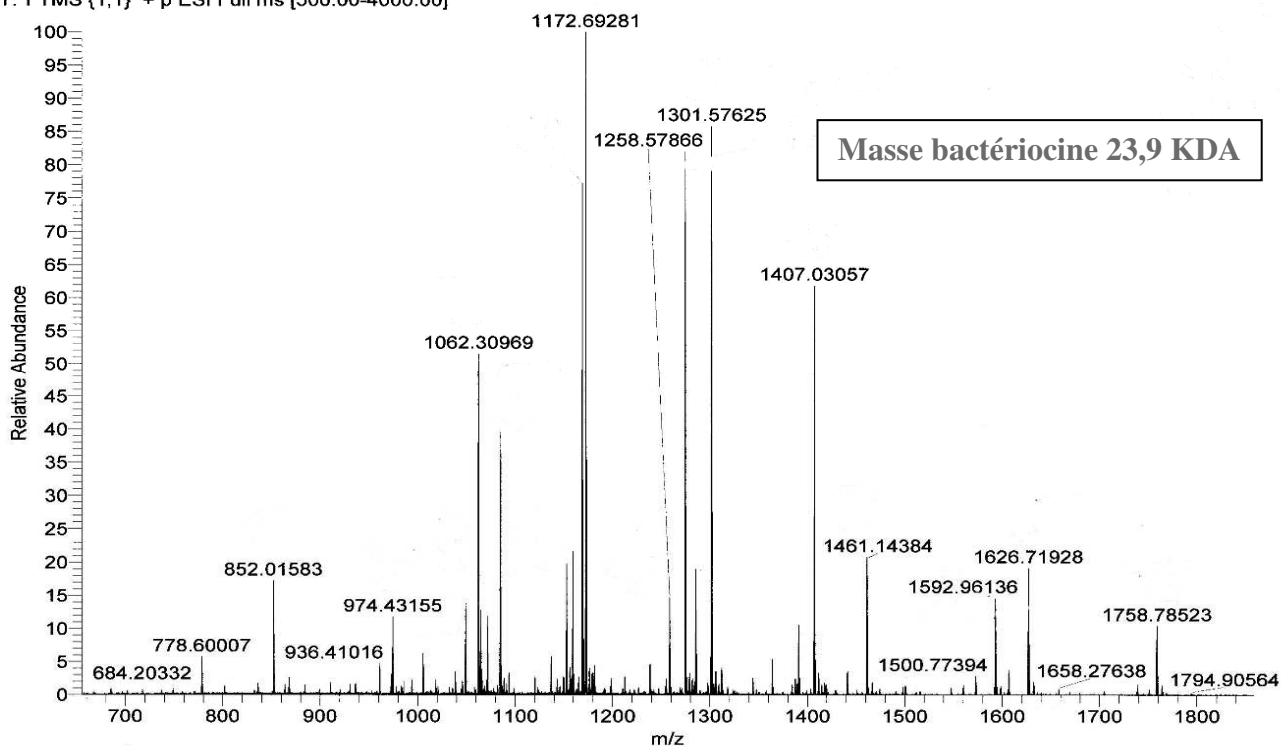


Figure 69 : chromatogramme RP – HPLC Adsorption - Désorption

HAC-5-5-bis #020-634 RT: 7.70-7.92 AV: 15 NL: 1.39E5
T: FTMS {1,1} + p ESI Full ms [500.00-4000.00]



Masse bactériocine 23,9 KDA

Figure 70 : Spectrométrie de masse de la bactériocine purifiée par adsorption désorption.

16- Discussion

Depuis leur découverte en 1925, de nombreuses bactériocines ont été isolées à partir de bactéries lactiques. La grande majorité appartiennent à la classe I et II, rarement à la classe trois. De nouvelles bactériocines sont découvertes avec de nouvelles fonctionnalités ce qui nécessite une mise à jour de la classification de bactériocines. En effet une quatrième classe a été suggérée pour les bactériocines complexes pouvant inclure des entités non protéiques bien que de telles structures n'aient pas encore été identifiées précisément. Les modifications de la classification de Klaenhammer (1993) réalisées ultérieurement ont été contestées et supprimées puisque aucun de ces peptides n'a été co-purifié avec sa partie glucidique ou lipidique (Nes et *al.* 1996 ; Drider et *al.*, 2006). Ce n'est que récemment que des bactériocines complexes portant un groupement lipidique ou glucidique, qui semblent être nécessaires pour leur activité ont été décrites Pithva et *al.* (2011).

Ces bactériocines sont relativement hydrophobes et stable à la chaleur. Certains d'entre elles peuvent être regroupés avec les bactériocines typiques produites par les bactéries lactiques selon la classification traditionnelle, tandis que d'autres sont atypiques et structurellement distincte des classes générales de bactériocines. Ces enterocines atypiques récemment jouent un rôle important dans le nouveau schéma de classification et incitent à un reclassement des bactériocines dans un nouveau régime. Dans notre cas il est probable que cette bactériocine peut appartenir à la classe III puisqu'elle possède un poids moléculaire assez important (supérieur à 15 et inférieur à 30KDa). Une étude portant sur les déterminants génétiques à l'origine de cette molécule est indispensable afin de la positionner dans un schéma de classification. Une étude sur son mode d'action peut apporter des éclaircissements sur son caractère bactériolytique (bactériolysine).

17- Production de la bactériocine anti-listeria

Compte tenu que la bactériocine diffère de celles identifiées chez les bactéries lactiques, la mise en œuvre des conditions de production semblent être justifiées. Les fermentations seront optimisées afin d'accroître l'activité par le choix d'un milieu de culture bon marché et une comparaison en mode batch recyclé entre cellules libres et immobilisées sur pouzzolane de la souche bactériocinogéniques.

17.1- Choix du milieu de culture

On s'inspirant de la composition du milieu Elliker nous avons retenu le jus de dattes (variété Ghars) et le lactosérum doux comme bases pour la conception du milieu de fermentation. Le bouillon Elliker a été utilisé comme milieu de référence. Dans le tableau 34

sont rapportées les compositions correspondantes à chaque milieu. Avant utilisation ils ont été ajustés à la même concentration initiale en sucres par dilution à l'eau distillée.

Tableau 34 : Composition des milieux (Elliker, lactosérum doux et jus de dattes) utilisés.

Désignation (g/l)	Elliker	Lactosérum	Jus de dattes
Sucres totaux	15	57,84	800 ±
Lactose	5	57,84	0
Glucose	5	0	400 ±
Saccharose	5	0	2.5 ±
fructose	0	0	350 ±
Protéines		13,80 ±	11.2 ±
Tryptone	20		
Gélatine	2,5		
Extrait de levures	5		
Acide ascorbique	0,5		
Acétate de sodium	1,5		
Cendres totales	5.4	7,66 ±	15,3 ±

17.2- Cinétique de croissance en condition planctonique

A pH initial de 6,5, inoculation par la préculture à 10^6 cfu.ml⁻¹ et incubation à 30°C, la croissance de la souche dans les milieux Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum (1:1) a été suivi par la mesure de la densité optique à 600nm et par dénombrement sur milieu gélosé correspondant. Les résultats trouvés sont illustrés dans les figures 69 et 70.

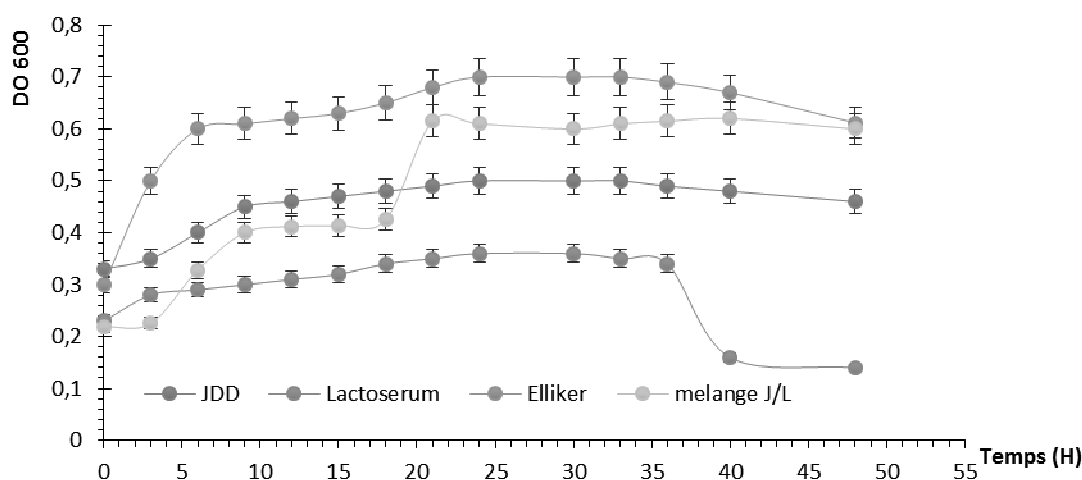


Figure 69 : Courbes de croissance de la souche *Lactococcus lactis subsp. cremoris c'* dans les milieux ; Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes –lactosérum à 30°C.

Les allures des courbes de croissance de la souche *Lactococcus lactis subsp. cremoris* se caractérisent selon le milieu de culture. Une croissance exponentielle active de 10 heures est remarquée dans le milieu Elliker suivi d'une légère ascendance jusqu'à 20 heures puis vient la phase stationnaire. Dans le cas du jus de dattes et du lactosérum les allures des courbes de croissance sont similaires mais avec des niveaux de DO différents. La phase exponentielle est moins précise dans le cas du lactosérum dans lequel la souche croit difficilement. L'entrée en

phase stationnaire est remarquée à partir de 20 heures de culture pour les deux milieux. Cependant dans le mélange jus de dattes – lactosérum une croissance diauxique est observée. La courbe de croissance rejoint presque celle d'Elliker après vingt heures de culture. Le maximum de croissance est atteint au bout de 20 h avec des valeurs de 0.35, 0.5, 0.62 et 0.7 unités DO respectivement dans le lactosérum le jus de dattes, le mélange jus de dattes – lactosérum et enfin le bouillon Elliker. Le taux de croissance (μ) et le temps de génération (G) calculés comme suit : entre $t_1=5$ et $t_2=18$ heures (tableau35)

Tableau 35 : Taux de croissance, temps de génération et variation du pH pour 24 heures de la souche cultivée sur Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum à 30°C.

Milieu	μ (h^{-1})	G	Δ pH (24 h)
Elliker	0,1	10	1.5
lactosérum	0,03	33,33	1.2
Jus de dattes	0,01	100	2
mélange	0,04	25	1.3

17.3- Evolution de la viabilité cellulaire

Afin de déterminer si la diminution de la densité optique pourrait résulter d'une lyse des cellules, des prélèvements de la souche à différents temps et dans chaque milieu de culture ont été effectués et dénombrés sur Elliker gélosé. Les résultats illustrés par la figure 70 montrent que les écarts dans la charge cellulaire ne sont remarquables qu'à partir de 14 heures de croissance mais se rejoignent avec une concentration finale de 10^9 cfu.ml⁻¹ après 35 heures de culture.

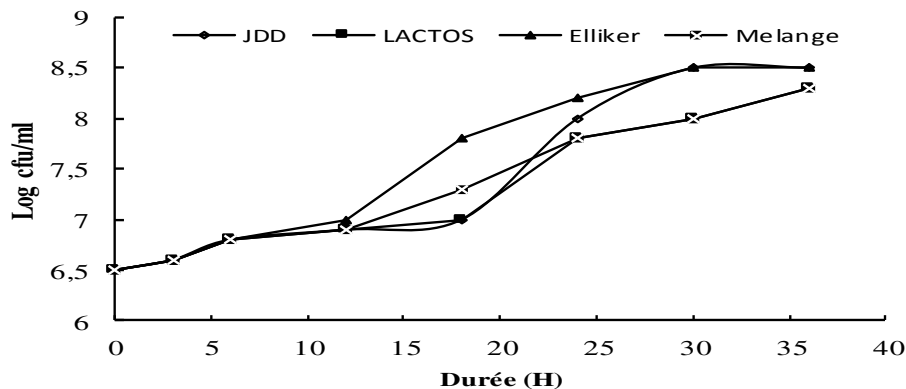


Figure 70 : Evolution de la viabilité cellulaire dans Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum à 30°C.

17.3- Evolution du pH

Le pH est le meilleur marqueur d'activité de la souche dans les différents milieux. La capacité de fermenter plus ou moins rapidement les sucres présents est un signe de bonne adaptation au milieu. Les écarts enregistrés sont les plus élevés dans le cas du jus de dattes et du milieu Elliker. L'aptitude à l'acidification est la plus marquée dans le cas du jus de dattes avec une baisse de deux unités pH en vingt-quatre au-delà de quarante heures les niveaux d'acidification se rejoignent. La chute du pH dans le cas du mélange et du lactosérum est moindre.

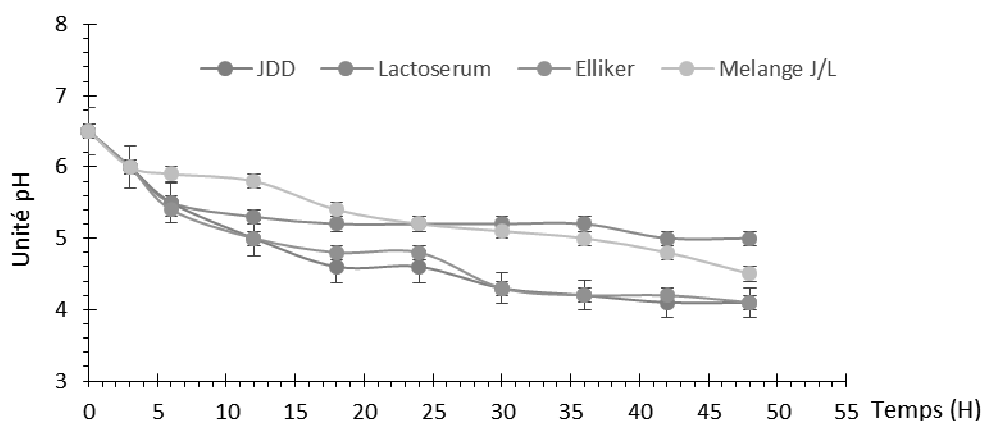


Figure 71 : Evolution du pH durant la croissance dans Elliker, jus de dattes, lactosérum et mélange jus de dattes – lactosérum à 30°C.

17.4- Utilisation des sucres

Dans cette étape nous avons comparé le comportement de la souche vis-à-vis des substrats glucidiques et de leur devenir afin d'établir la relation avec la production de la bactériocine.

17.5- Le milieu lactosérum

Dans le lactosérum nous remarquons que le galactose disparaît rapidement du milieu. Le lactose diminue progressivement passant de 20 à 15 g/l et la production du lactate équivalente atteint 2.5 g/l. Les allures des courbes montrent des évolutions lentes que ce soit en utilisation du lactose ou en accumulation de ces métabolites notamment le lactate. Le lactosérum seul paraît être inadapté à la souche. L'absence d'acétate et d'acétoïne est notée.

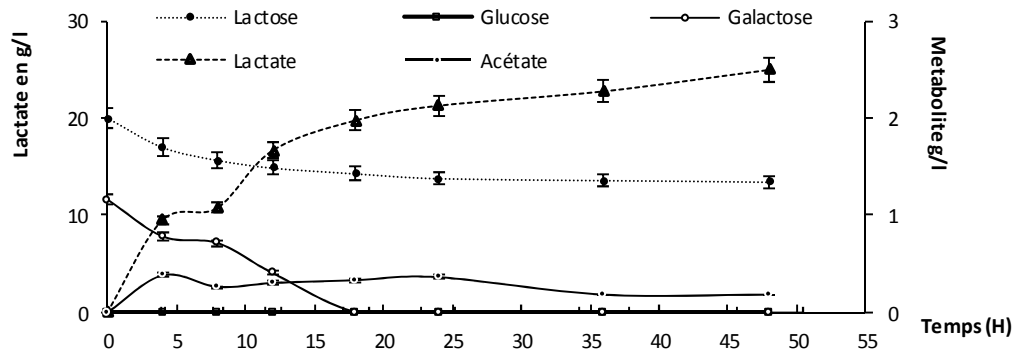


Figure 72 : Consommation des sucres et production de lactate dans le lactosérum par la souche *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

17.5.1- Le milieu jus de dattes

Le glucose et le fructose sont les sucres majoritaires du jus de dattes et sont rapidement convertis en lactate dès les premières heures de fermentation. La souche produit le maximum de lactate (5 g^{-1}) dans les premières dix heures de fermentation.

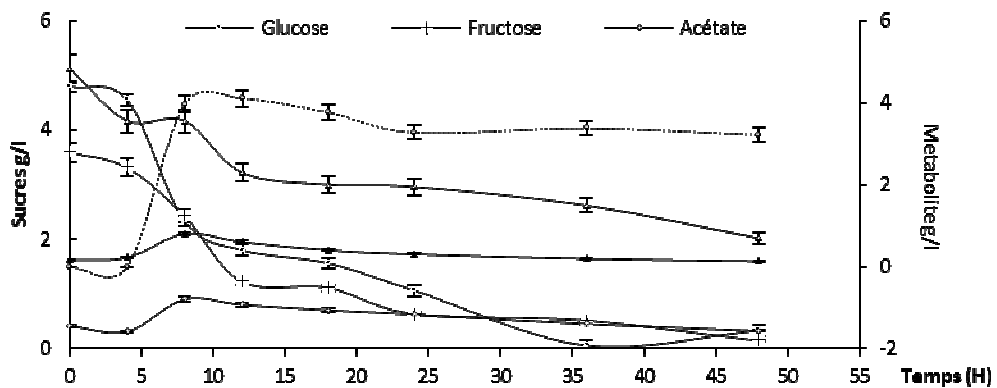


Figure 73 : Consommation des sucres et production de lactate dans le jus de dattes par la souche *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

Ce rythme est quasi maintenu jusqu'à la fin du processus de fermentation coïncidant avec l'épuisement en sucres fermentescibles ou la concentration en lactate se nivelle à 4 g/l . Par ailleurs la production de faibles quantités d'acétate et d'acétoïne est remarquée avec une cadence similaire. Les pics de production coïncident avec celle du lactate.

17.5.2- Le milieu Elliker

Dans le milieu Elliker le comportement est particulier. L'allure de production du lactate est fluctuante et est constante durant les 4 premières heures puis progresse jusqu'à 25 heures de fermentation ou elle atteint un pic de 7 g/l avant de chuter à 5 g/l jusqu'à la fin de culture. Le glucose est toujours le premier sucre utilisé. Il est épuisé avant les dix heures de fermentation par contre le lactose est moins sollicité. L'acétate et l'acétoïne sont formées en quantité dès les

premières heures de fermentation. Avec des quantités moindres comparées à au milieu Elliker ou le jus de dattes.

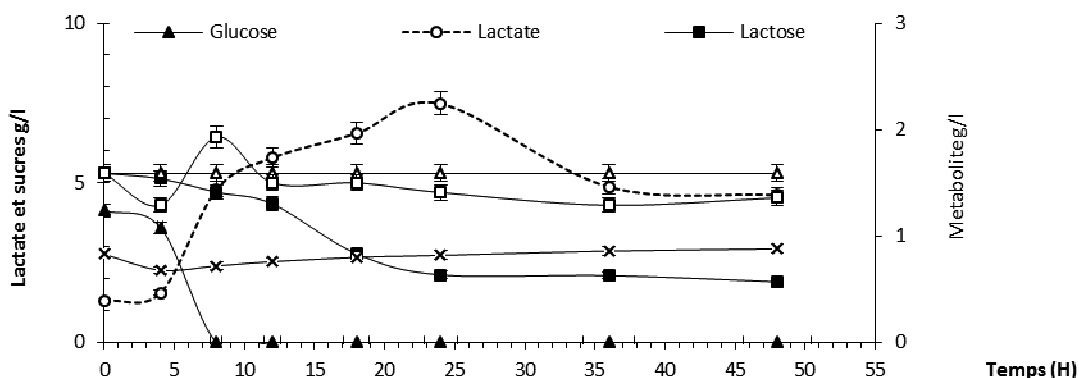


Figure 74 : Consommation des sucres et production de lactate dans le milieu Elliker par la souche *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

17.5.3- Le milieu Mélange jus de datte - lactosérum

Dans ce mélange l'acidification est très rapide. La formation du lactate apparait dès les premières minutes de fermentation. La progression est proportionnelle au temps d'incubation et continue d'accroître jusqu'à atteindre un niveau de 3.4 g/l et est soutenu jusqu'à la fin de la fermentation. La même allure dans la consommation du glucose et du fructose est notée.

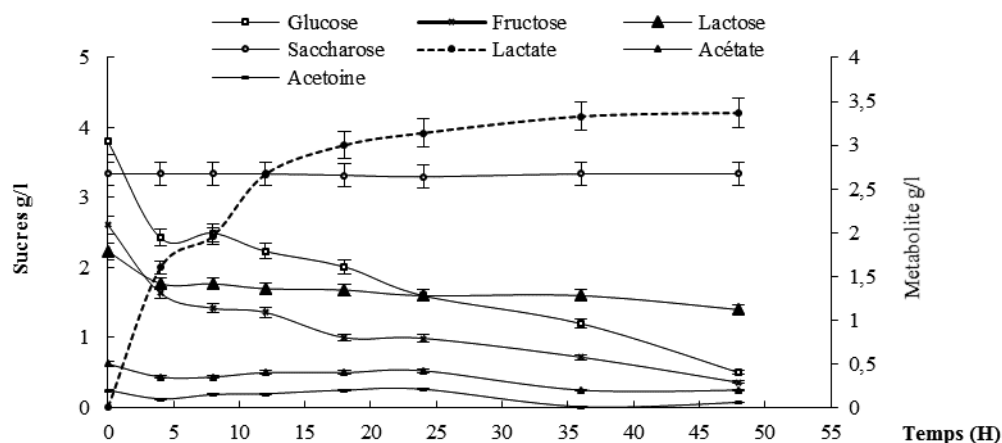


Figure 75 : Consommation des sucres et production de lactate dans le mélange jus de dattes -lactosérum par la souche *Lactococcus lactis subsp. cremoris C'*

18- Evolution de la production de la bactériocine

18.1- Evolution du diamètre d'inhibition

Nous remarquons des allures identiques dans l'évolution des diamètres d'inhibition de *listeria innocua* mais avec des niveaux différents (figure 76). Les diamètres sont plus importants respectivement dans le milieu mélange (M), le jus de dattes (JDD), le lactosérum (L) et en

dernier le milieu Elliker (E). Le maximum est atteint après 25 heures d'incubation pour l'ensemble des milieux.

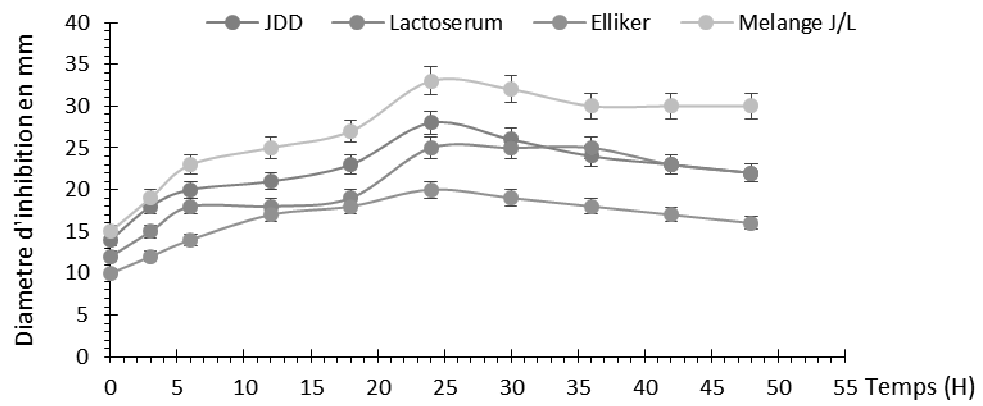
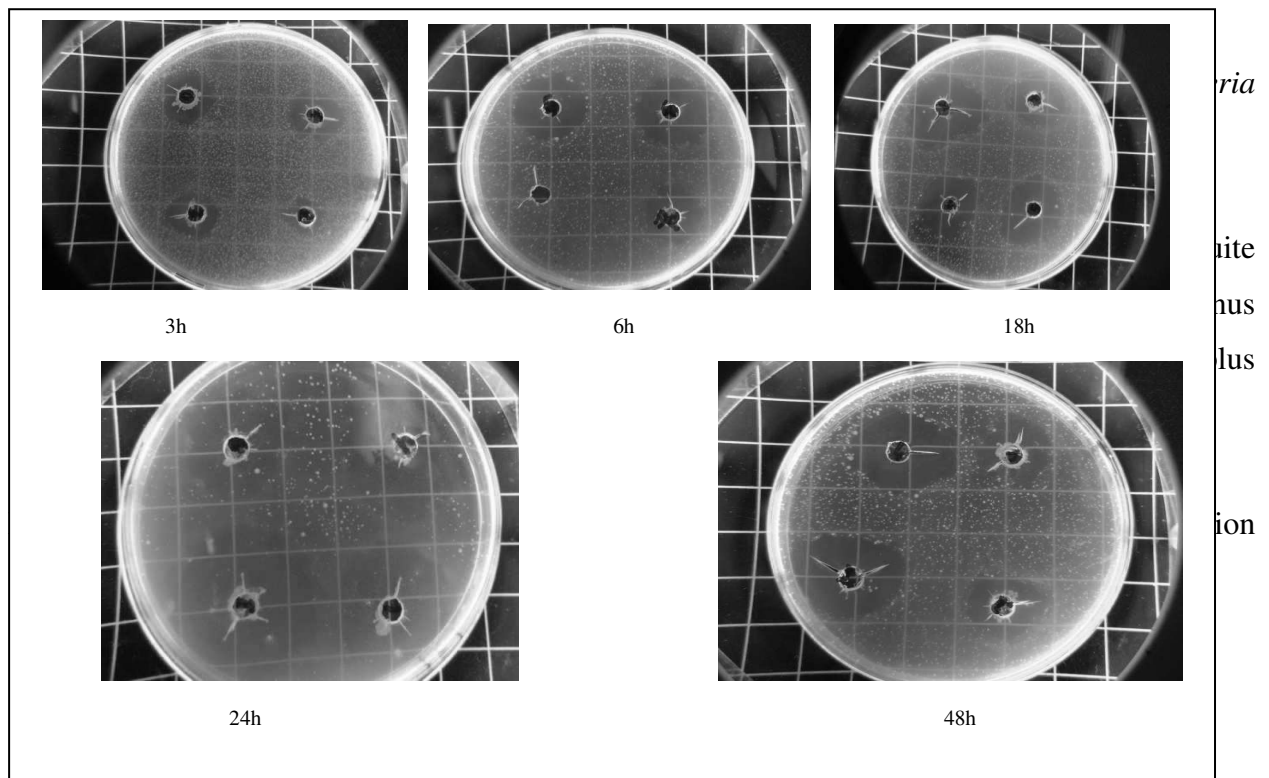


Figure 76 : Diamètre d'inhibition de *Listeria innocua* par la bactériocine produite dans le milieu en fonction du temps en culture planctonique



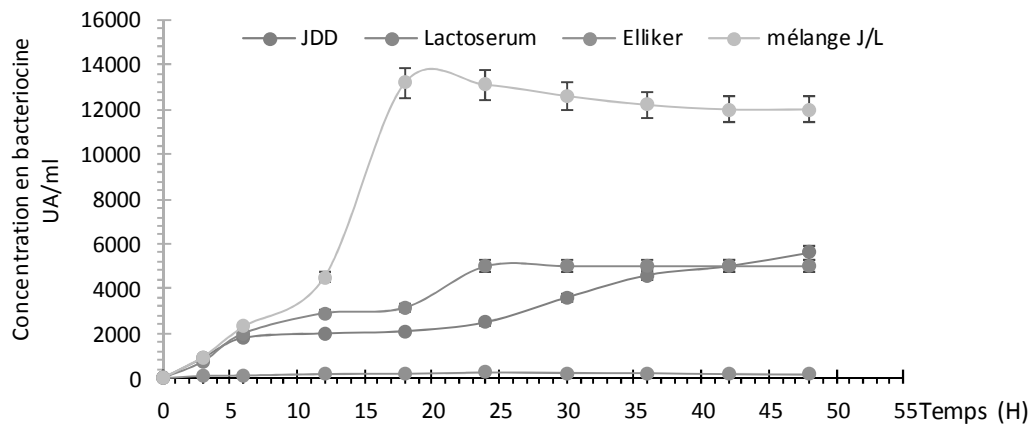


Figure 78 : Evolution de la concentration en bactériocine exprimée en UA ml⁻¹ pour les différents milieux de culture en culture planctonique.

La concentration est 55 fois supérieure à celle du milieu Elliker (250 UA ml⁻¹) dans Elliker et 13000 UA ml⁻¹ dans le mélange). La production est proportionnelle au temps d'incubation durant les 12 premières heures (Figure 78). Le pic est atteint à partir de la quinzième heure et reste maintenu jusqu'aux vingt-cinquièmes heures pour diminuer après de façon progressive de 15 à 28 heures. Les niveaux obtenus avec le jus de dattes et le lactosérum sont moindres que le mélange qui permet de produire en moyenne, vingt fois plus que le milieu d'Elliker.

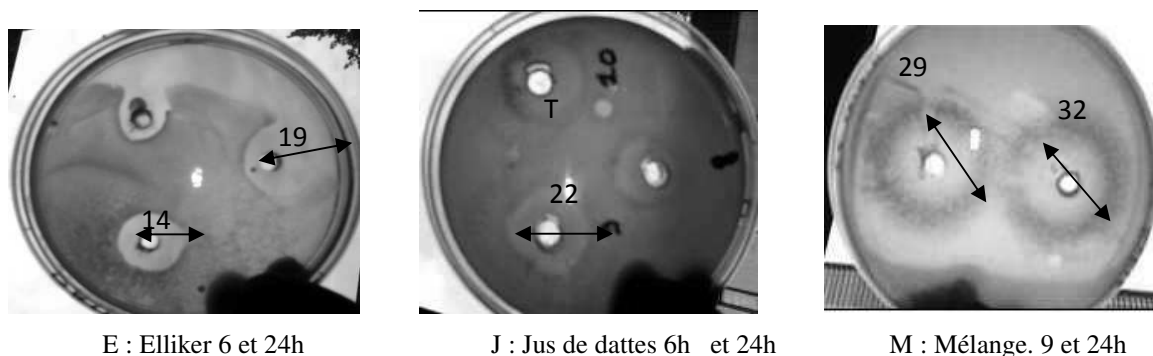


Figure 79 : Les diamètres des zones d'inhibition des différents surnageants des cultures dans les trois milieux en batch à cellules libres.

18.2- Production de la bactériocine par fermentation à l'aide de cellules immobilisées

Dans une seconde étape nous avons étudié la capacité de production de la bactériocine dans un système de conduite en batch recyclé ou la souche est immobilisée dans la pouzzolane.

18.3- Evolution de la formation du biofilm

La mesure de la concentration en bactériocine a été effectuée après colonisation du support durant le régime stationnaire. Pour cela nous avons déterminé la colonisation du support par la souche dans chaque milieu jusqu'à saturation (correspondant au régime stationnaire) et les résultats trouvés sont représentés par la figure 80.

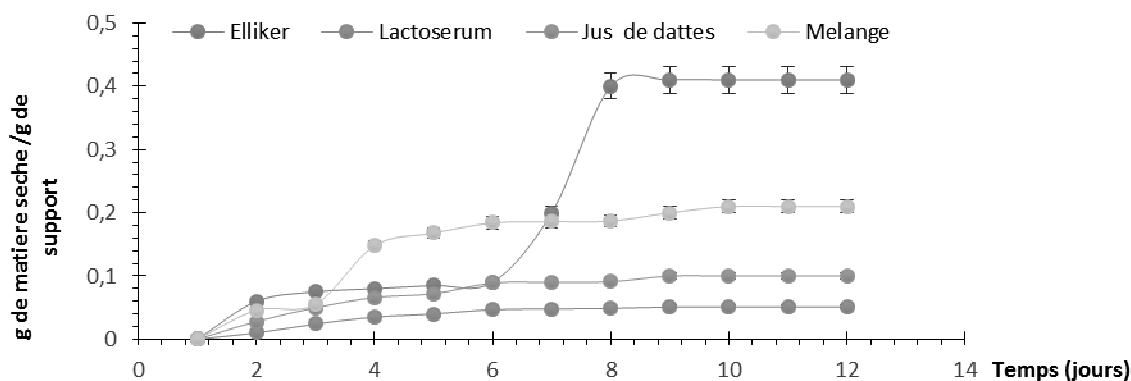


Figure 80 : Evolution du biofilm (biomasse fixée) en fonction du temps sur le support dans les quatre milieux

Nous remarquons qu'après le sixième jour d'incubation la biomasse fixée se stabilise. Mais les niveaux de concentration cellulaire ne sont pas identiques. Le niveau le plus élevé est obtenu dans le mélange et le plus bas dans le lactosérum. Les valeurs de la biomasse fixée d'Elliker et du jus de dattes sont intermédiaires. Quel que soit le milieu de culture utilisé les niveaux de production sont de loin très élevés comparé à la conduite planctonique (figure 78). Dans le mélange jus de dattes – lactosérum une production maximale de 28000 UAml⁻¹ en bactériocine est atteinte après deux heures de fermentation elle se stabilise jusqu'à cinq heures pour chuter ensuite.

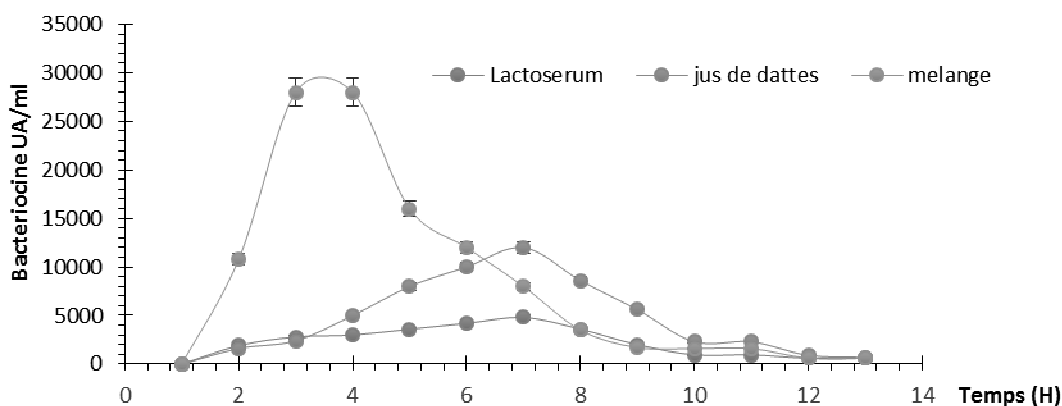


Figure 81 : Production de la bactériocine en UA ml⁻¹ en batch recyclé par la souche immobilisée sur pouzzolane (50% p/v).

Par contre dans le lactosérum et le jus de dattes elle progresse pour atteindre un maximum de 4800 et 12000 UAm^l⁻¹ respectivement pour la même durée. Au-delà de huit heures de fermentation la concentration en bactériocine baisse pour s'estomper à la fin. A l'état de cellules fixées la souche libère dans le mélange une concentration deux fois supérieures à celle en condition planctonique dans le même milieu.

L'excrétion de la bactériocine débute après 3h d'incubation dans les trois milieux avec des niveaux de production différents. La technique d'immobilisation des cellules a été employée afin d'augmenter la biomasse et ainsi la production totale. L'immobilisation des cellules permet en outre d'obtenir une densité bactérienne supérieure à celle observée par la souche en culture libre. Les figures 82 et 83 représentent les diamètres des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation des surnageants de la souche Lcl.c' fixé sur 50 % de pouzzolane et avec les trois milieux de culture. D'après ces deux figures l'inhibition est détectée après 3h de fermentation, les meilleurs résultats obtenus sont après 24 h d'incubation avec les trois milieux. Le diamètre le plus important de 40mm est atteint après 24h lorsque la souche Lcl.c' est incubée dans le JDD mélangé au lactosérum et fixée sur support de 50% (p/v) de pouzzolane. Une corrélation très hautement significative est enregistrée entre la production de la bactériocine et le milieu de culture ($R^2 = 0.96$) ainsi que du mode de conditionnement des cellules ($R^2 = 0,99$)

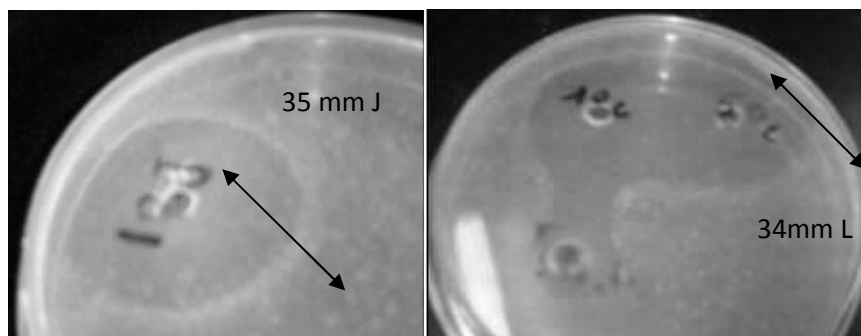


Figure 82 : Diamètre d'inhibition après 24 heures de culture sur jus de dattes et lactosérum en culture planctonique

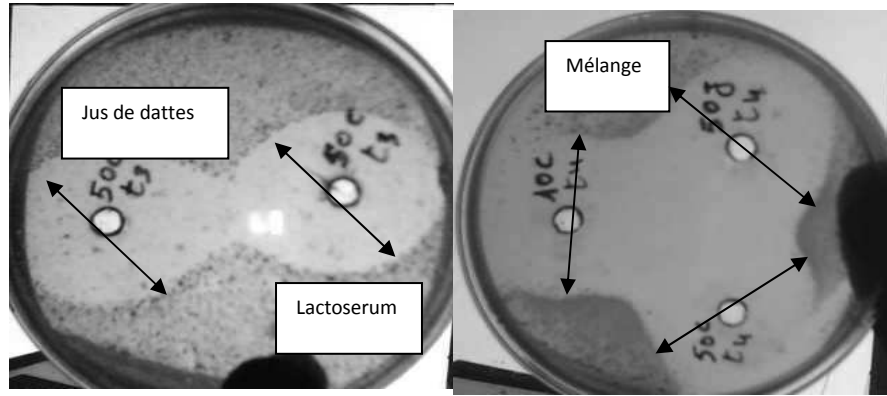


Figure 83 : les diamètres des zones d'inhibition des différents surnagent des cultures dans les trois milieux en batch à cellules immobilisées. 5

19 – Discussion

En comparant avec l'état libre de la souche on constate que l'activité de production de la bactériocine est beaucoup plus élevée lorsque les cellules sont fixées. D'après les figures 77 et 78 La production de la bactériocine est maximale durant la phase exponentielle de croissance, Le titre maximal 16 UA ml^{-1} est atteint dans le JDD mélangé avec du lactosérum après 9h d'incubation, la même valeur est obtenue en utilisant le JDD non supplémenté mais après 24h d'incubation. Ce titre représente le double du titre en bactériocine obtenu en utilisant le milieu Elliker avec *Lc.c'* immobilisée sur 50 % de pouzzolane. Selon Dirk (2002), l'immobilisation augmente la productivité à cause d'une densité de biomasse plus élevée et augmente aussi le rendement pour la production de métabolites (telle que les bactériocines). Selon Rubio (2002) par la modification de 38 % des gènes au cours du développement du biofilm et selon Grattepanche (2005) par l'amélioration de la stabilité plasmidique des cellules à l'état immobilisé. Après avoir atteint un plateau, les diamètres des zones d'inhibition diminuent très lentement dans le temps lors de la phase stationnaire en comparant avec l'état libre.

References bibliographiques

A

- Abd El-Moneim Afify M.R., Ramy Romeilah M., Shaimaa sultan M., Mona Hussein M., (2012).** Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *International Journal of Academic Research* Vol. 4. No. 6.
- Akin H., (2008).** Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins: modélisation et interprétation métabolique. Thèse de doctorat de l'INP France.
- Albano H., Oliveira M., Aroso R., Cubero N., Hogg T., and Teixeira P., (2007).** Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from "Alheiras" (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays, *Meat Science*, 76, pp 796-800.
- Al-Farsi M., Al-Asalvar C., Al-Abid M., Al-Shoaily K., Al-Amry M., Al- Rawahy F., (2007).** Compositional and functional characteristics of dates syrups and their by-products. *Food Chem.* 104(3): pp 943-947
- Altermann E, Russell WM., Azcarate-Peril MA., Barrangou R, Buck BL., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer TR., (2005).** Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: pp 3902-3912
- Alvarez-Olmos MI. and Richard Oberhelman A., (2001).** Probiotic Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy. *The Infectious Diseases Society of America*, pp 1058-4838.
- Alvarez-Cisneros Y.M., Sáinz Espuñes T.R., Wachter C., Fernande F.J E and Ponce-Alquicira E., (2011).** Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Méndez-Vilas (Ed.) pp 1330-1341.
- Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F., Shah N.P., (2006).** Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*. vol. 16, pp 40-51.
- Ammor S. Rachman C., Chaillou S., Revost H., Dousset X., Zagorec M., Doufour R, Chevalier I., (2005).** Phenotype and genotype identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiol.* 22, pp 373-382.
- Ammor M.S., Fores A.B. et Mayo B., (2007).** Antimicrobial resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 24: pp 559-570.
- Ansorena D., Montel M.C., Rokka M. et al., (2002).** Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*. vol. 61, pp 141-147.

Antra N.S., Sujaya I.N., Yokota A., Asano K., Tomita F., (2004). Effects of indigenous starter cultures on the microbial and physicochemical characteristics of Urutan, a Balinese fermented sausage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. vol. 98, pp 92-98.

Arnal A., (1999). Mémoire de fin d'études, 80 pp, ENITAC.

Aymerich Artigas, Garriga, Monfort and Hugas. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 88 pp 686–694.

B

Ballesteros C., Poveda J.M., González-Viñas M.A. and L. Cabezas., (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17: pp 249-255.

Baliarda A., Hervé R., Mohamed J., Carlos Blanco Alain Deschamps Claire Le Marrec., (2003). Potential osmoprotectants for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophila*. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier, 84 (1), pp.13-20.

Baruzzi F., Matarante A., and Caputo L., Morea M., (2006). Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Science*. vol. 72, pp 261-269.

Bassit N., Boquien C-Y., Picque D., Corrieu G., (1995). Effect of temperature on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* CNRZ 483. *J.Dairy Res.* 62: pp 123-129.

Belas Belaribi N., Semcha M. and Laoufi L., (2003). Influence de la pouzzolane de Beni-saf sur les caractéristiques mécaniques des bétons. *Canadian Journal of Civil Engineering*, 30: pp 580–584.

Bertrand N., Fliss, and Lacroix C., (2001). High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719. *International Dairy Journal* 11: 953-960

Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* pp 72- 248.

Bradley R.L., Arnold E., Barbano D.M., Semerad R.G., Smith D.E. and Vines B.K., (1992). **Chemical and physical methods.** In: R.T. Marshall (Ed.) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th. American Public Health Association, Washington, DC: pp 433–531.

Bekhouche F., (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et Optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase. Thèse de doctorat d'état, INATAA université Mentouri Constantine.

- Bekhouche F., Bachir-Cherif et Gheribi M. (1998).** "Isolement et identification de bactéries lactiques à partir de lait cru de vaches", XIème Journées Nationales de Microbiologie. Oran. Algérie. 30 novembre et 1 Décembre.
- Breukink E. and de Kruijff B., (2006).** Lipid II as a target for antibiotics." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(4): pp 321-332.
- Bettache Guessas and Mebrouk Kihal, (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (6), pp. 339-342.
- Bellon-Fontaine M.N., Rault J., Van Oss C.J. (1996).** Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces Biointerfaces*. 71: pp 147–153.
- Benito, M.J., Serradilla, M.J., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Nevado, F. and Córdoba, M.G. (2008):** Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science* 80 (3): pp 656-661.
- Benninga H., (1990).** *A History of Lactic Acid Making*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp.1–59.
- Berada N., Meland LE., Laroch J.F., Thouvenot GP., Piaia M., (1991).** Bifidobacterium from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.*, 74: pp 409–413.
- Bergonnier D., Blanc M.C., Fleury B., Lagriffoul G., Barillet F., Berthelot X., (1997).** *Rencontre Recherches Ruminants*, 4: pp 251-260.
- Bérodier A., Parguel P., Dasen A., Duboz G., Renaud J.P., Billot M., Bérodier F., Ducret J.B., Marguet B., (2001).** Validation du test de lactofermentation en filière Comté (1999-2000). *Comité Technique du Comté*, Poligny, 90 p.
- Bersuder P., Hole M., Smith G., (1998).** Antioxidants from a heated histidine glucose model system I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 75: 181-187.
- Biggadike I., Ohnstad H.J., Laven R.A., Hillerton J.E., (2002).** *Detecting Mastitis Automatically*. *Proceedings of the British Mastitis Conference*: pp. 58–62.
- Bradley A.j., Greent M.J. (2000).** A study intramammary enterobacterial infection aquired during the dry period. *J. Dairy. Scien*, 83: pp 1957-1965.
- Bolotin A., Ehrlich SD., Sorokin A., (2002).** Studies of genomes of dairy bacteria *lactococcus lactis*. *Club des bacteries lactiques* n°11, 22 : pp 45-53.

- Boquien C.Y., Desmazeaud M.J. et Corrieu G., (1988).** Suivi des populations mixtes de bactéries lactiques mésophiles utilisées en industrie laitière. Colloque Alimentation Transformation des Produits agricoles et Nutrition. APRIA, Paris.
- Bonizzi I., Buffoni J.N., Feligini M and Enne G., (2009).** Investigating the relationship between raw milk bacterial composition, as described by intergenic transcribed spacer-PCR fingerprinting, and pasture altitude Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.
- Boonaert C.J.P., Rouxhet P.G., (2000).** Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physico-chemical properties. Appl. Environ. Microb. 66: pp 2548-2554.
- Bouton Y., Tessier L., Guyot T.P. and Beuvier E., (2005).** Relationships between dairy farmer practices and the level of microbiological population in milk used for Comté cheese making). Proc. 12th Rencontres Recherches Ruminants Conf.: pp 403-403.
- Bolotin A., Ehrlich SD., Sorokin A. (2002).** Studies of genomes of dairy bacteria *Lactococcus lactis*. Club des bactéries lactiques n°11, 22: pp 45-53
- Bozkurt H., Erkmén O., (2002).** Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). Meat Sci. 61 : pp 149-156.
- Bourgeois Claude-Marcel , Larpent Jean-Paul, (1996).** Microbiologie alimentaire. Tome 2. Aliments fermentés et fermentations Tec & doc-Lavoisier, 2e éd.
- Buckenhuskés H.J., (1993).** Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Reviews. vol. 12: pp 253-271.
- Burianek LL., Yousef AL., (2000).** Solvent extraction of Bacteriocins from liquid cultures. Letters in Appl. Microbiol. 31: 193-197.
- C**
- Cachon R., Antérieux P., Diviès C., (1998).** The comparative behaviour of *Lactococcus lactis* in free and immobilized culture processes. J. Biotechnol. 63: pp 211-218.
- Camus A., Laniesse P., Burdin J., (1951).** La formation du diacétyle dans les levains de beurrerie. 31 (305 306) : pp.225-233.
- Carlos Raimundo Ferreira Grosso and Carmen Sílvia Fávoro-Trindade, (2004).** Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yogurt", Braz. J. Microbiol. Vol.35 no.1-2 Sao Paulo
- Carunchia Whetstine M. E., Drake M. A., Nelson B.K. and Barbano D., (2006).** Flavor profiles of full fat, reduced fat and cheese fat made from aged Cheddar with the fat removed using a novel process. J. Dairy Sci. 89, 505-517.
- Carvalho A., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F.X. and Gibbs P., (2003).** Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried

Enterococcus faecalis and *Enterococcus durans*. J. Applied Microbiol., 94 : pp 947-952.

- Casalta, E., Sorba, J. M., Aigle, M. and Ogier J. C., (2009).** Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. Int. J. Food Microbiol. 133: pp 243-251.
- Casaburi A., Aristoy M.C., Cavella S., Di Monaco R., Ercolini D., Toldrá F., Villani F., (2007).** Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. Meat Sci. 76: pp 295-307
- Chammas G.I., Saliba R. and Béal C., (2006).** Characterization of the fermented milk Laban with sensory analysis and instrumental measurements. J. Food Sci. 71: pp 156–162
- Chatain Ly M.H., Thanh Le M.L., Belin M., Wache J.M., (2010).** Cell surface properties affect colonisation of raw milk by lactic acid bacteria at the microstructure level Food Res. Int., 43: pp. 1594–1602
- .Cenci-Goga B.T., Ranucci D., Miraglia D., Cioffi A., (2008).** Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage. Meat Science 78 pp: 381–390.
- Cervinkova D., Vlkova H., Borodacova I., Makovcova J., Babak V., Lorencova A., Vrtkova I., Marosevic D., Jaglic Z., (2013).** Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. Veterinarni Medicina, 58, (11): pp 567–575.
- Cesena C., Morelli L., Alander M., Siljander T., Tuomola E., Salminen S., Mattila-Sandholm T., Vilpponen-Salmela T. and von Wright A., (2001).** *Lactobacillus crispatus* and its non-aggregating mutant in human colonization trials. Journal of Dairy Science. 84: pp 1001–1010.
- Champagne, C.P., Lacroix, C. and Sodini-Gallot, I. (1994).** Immobilized culture of lactococci entrapped in two-layer calcium alginate gelbilized cell technologies for the dairy industry. Critical Reviews beads. Biotechnology Letters 14, 583–588.in Biotechnology 14, pp 109–134.
- Chen H., Hoover D.G. (2003),** Bacteriocins and their food applications, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2: pp 82–100.
- Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabous A., (2008).** Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 Microbiol Res, 163: pp. 684–692.
- Cheriguene A., Chougrani F., Bekada AMA, El Soda M., Bensoltane A., (2007).** Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goat's milk. Afr. J. Biotechnol. 6 (15): pp 1854-1861.

- Choisy C., Desmazeaud M., Gripon J.C., Lamberet G., Lenoir J. and Tourneur C., (1987)** .Microbiological and biochemical aspects of ripening. In: A. Eck (editor), Cheese making Science and Technology. Lavoister Publishing Inc., New York and Paris : pp. 62-100.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez M.J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C., Rodriguez E., (1997).** Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.*, 64: pp 409–421.
- Cogan T.M. and Daly C., (1987).** Cheese starter cultures. Page 179 in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. I. General Aspects. P. F. Fox, ed. Elsevier Appl. Sci. Publ., Ltd., London, England.
- Cogan T. M., (1980).** Les levains lactiques mésophiles. *Une revue* 60 (597) : pp.397-425
- Cogan T.M., (1981).** Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis*. *J. Dairy Res.*, 48: pp 489-495.
- Collins J.W., La Ragione R. M., Woodward M.J. and Searle L.E.J., (2009).** Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. In: *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, Springer Science Business Media B.V., New York, NY, USA: pp. 1123–1192.
- Corroler, D., Mangin I., Desmaures N. and Gueguen M., (1998).** An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4729-4735
- Cotter P.D., Hill C. and Ross R.P., (2005).** Bacteriocins: Developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol.* 3: pp 777–788.
- Collado, M.C., Meriluoto J. and Salminen S., (2007).** Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen starters. *European food research and technology* 226: pp 1065-1073
- Corroler D., Desmaures N., Gueguen M., (1999).** Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterisation of dairy Lactococcus isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: pp 91-99.
- CORPE W. A., (1970).** An acid polysaccharide produced by a primary film-forming bacterium. *Dev. Ind. Microbiol.* 11: pp 402-4 12.

D

- Daechel M.A., Andersson R.E., Fleming H.P., (1987).** Microbial ecology of fermenting plant materials, *FEMS Microbiol. Rev.* 46: pp 357–367.
- Dalmaso M., Prestoz S., Rigobello V., Demarigny Y., (2008).** Evolution of raw cow milk microflora, especially lactococci, enterococci, leuconostocs and lactobacilli over a successive 12-day milking regime. *Int. J. Dairy Sci.* 3: pp 117-130.

- Dalmis Ü. and Soyer A., (2008).** Effect of processing methods and starter culture (*Staphylococcus xylosus* and *Pediococcus pentosaceus*) on proteolytic changes in Turkish sausages (Sucuk) during ripening and storage.
- Datta R., Tsai S.P., Bonsignore P., Moon S.H., Frank J.R., (1995).** Technological and economic potential of polylactic acid and lactic acid derivatives, FEMS Microbiol. Rev. 16: pp 221–231.
- De Backer L., (1996).** Immobilisation of cells in porous carriers. Pages 373 dans R.G. Willaert, G.V. Baron, and L. De Backer, eds. *Immobilised living cell systems: Modelling and experimental methods*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. and Janssens, D., (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris : Lavoisier.
- De Roissart H.B., (1986).** Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp : 343-407
- Desmazeaud M., (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques
- De man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E., (1960).** A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Microbiol., 23(1) : pp 130-135.
- Desmaures N., (1995).** Étude des laits de haute qualité : caractéristiques et aptitude microbiologique à la transformation en camembert au lait cru. Thèse de doctorat de l'université de Caen.
- Desmaures N., Bazin F. and Gueguen M., (1997).** Microbiological composition of raw milk farms in the camembert region of Normandy. J. Appl. Microbiol., 88: pp 53-58.
- Desmazeaud, M., (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. Le Lait, 63 : pp 286-316.
- Desmazeaud M., (1992).** Les bactéries lactiques in : les groups microbiens d'intérêt laitiers CEPIL (Ed.) Paris, pp 9-60.
- Desmazeaud, M.J. et de Roissart H., (1994).** Métabolisme général des bactéries lactiques, Bactéries lactiques, Ed. de Roissart, H., et *al.*, Lorica-Uriage, 1 : pp 169-206
- Desmazeaud N., Radiguet S., Lejeune J., Gueguen M., (1995).** Effect of ripening on the microbiological profile of high quality raw-milk for cheese - making *Milchwissenschaft-Milk Science International* 50: pp 193-195.
- Demirci A., Pometto AL., (1992).** Enhanced production of D(-) lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC9649. J. Ind Microbiol 11 : pp 23- 28

- Denis Catherine, Beal Catherine, Bouix Marielle, Chamba Jean-François, Jamet Emmanuel, Ogier Jean-Claude, Panoff Jean-Michel, Rault Aline, Thammvongs Bouachanh, Thierry Anne, (2006).** Congélation de micro-organismes d'intérêt laitier : optimisation des conditions d'adaptation des souches avant congélation et des conditions de remise en culture après congélation Les Actes du BRG,6 (2006) : pp 433-448 © BRG.
- Del Re B., Sgorbati B., Miglioli M. and Palenzona D., (2000).** Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31 : pp 438–442.
- De Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C., Schrezenmeir J., (2001).** Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* , 73: pp 421-429.
- Dervin C., (1992). Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle des correspondances, collection STAT-ITCF, paris.72 p.*
- De Vuyst L., Camu N., De Winter T., Vandemeulebroecke K., Van de Perre V., Vancanneyt M., De Vos P. and Cleenwerck I., (2008).** Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int J Food Microbiol* 125 : pp79–90.
- Devriese LA, Pot B., Van Damme L., Kersters K., Haesebrouck F., (1995).** Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 26 : pp 187-197.
- De Vuyst L., Camu N., De Winter T., Vandemeulebroecke K., Van de Perre V., Vancanneyt M., De Vos P. and Cleenwerck I., (2008).** Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid
- Deumier F., Bohuon R., Trystram G., Saber N., Colligan A., (2003).** Pulsed vacuum brining bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int J Food Microbiol* 125: pp 79–90
- De Vuyst E. and Vandamme J., (1994).** Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Application, L. (Eds.), Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Dicks LMT., Fantuzzi L., Gonzales FC., Du Toit M., Dellaglio M., (1993).** *Leuconostoc argentinum* sp.nov isolated from argentine raw milk. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 : pp 347-351
- Diday E., Lemaire J., Pouget J. et Testu F., (1982).** *Eléments d'analyse des données* (Paris : Dunod).

- Diep D.B and Nes, I.F., (2002).** Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram-positive bacteria. *Current. Drug Targets*, 3: pp 107-122.
- Dilmi-Bouras A., Sadoun D., (2002).** Survie des ferments du yaourt dans le tube digestif du lapin, *Lait*. 82 : pp 47-253.
- Dilek Kaya Ozdogana, Nefise Akcelika, Belma Aslimb, Zekiye Suludereb and Mustafa Akcelika, (2014).** Probiotic and Antioxidative Properties of *L. Lactis* LL27 Isolated from Milk *Biotechnol. and Biotechnol. eq.* 26/11
- Dirk Bergmaier, (2002).** Production d'exopolysacchides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb rhamnosus* RW-9595M d'un milieu a base perméat de lactosérum. Thèse de pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) Département des sciences des aliments et de la nutrition l'Université Laval QUÉBEC.
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen L.M., Prévost H., (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: pp 564–582.
- Drosinos E.H., Mataragas M., Kampani A., Kritikos D. and Metaxopoulos I., (2006).** Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Sci* 73: pp 75–81.
- Drosinos E.H., Paramithiotis S., Kolovos G., Tsikouras I. and Metaxopoulos I., (2007).** Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology* 24: pp 260–270.
- Dortu Carine et Philippe Thonart (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13(1): pp 143-154.
- Dunne, C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G. C., Shanahan F. and Collins J. K., (2001).** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: pp, 386S-392S.
- Durlu-Ozkaya F., Xanthopoulos V., Tunail N. and Litopoulou-Tzenataki E., (2001).** Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes milk. *J. Appl. Microbiol.*; 91: pp 861–870.
- Dundar H., (2006).** Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Ph.D. thesis, Department of Biotechnology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Turkey.
- Dunne W.M. Jr., (2002).** Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately?. *Clin Microbiol Rev* 15: pp 155–166.

Dos Santos A.B., de Madrid M.P., Stams A.J.M., van Lier J.B. and Cervantes F.J., (2005). Azo dye reduction by mesophilic and thermophilic anaerobic consortia. *Biotechnol Prog* 21: pp 1140–1145.

Donlan RM., (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Diseases* 8 : pp 881–890.

Douaoui A., Gascuel OC., Walter C., (2004). Infiltrabilité et érodibilité de sols salinisés de la plaine du Bas Cheliff (Algérie) Mesures au laboratoire sous simulation de pluie. *E.G.S* 11(4): pp 379-392.

Duval J., (1995). Treating mastitis without antibiotics. *Ecological Agriculture Projects*, McGill University. <http://eap.mcgill.ca/agrobio/ab370-11.htm> Duval, J. 1993. Le souci. *Ecological agriculture projects*. <http://eap.mcgill.ca/agrobio/ab350-06.htm>.

Du plessis H.W., Dicks L.M.T., Ipretorus S., Lambrechets M.G. and Dutoit M., (2004). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *Int. J. Food Microbiol.* 91: pp 19-29.

E

Ekmekçi H., Aslim B. and Darilmaz D.O., (2009). Some factors affecting the autoaggregation ability of vaginal lactobacilli isolated from Turkish women. *Archives Biological Sciences, Belgrade.* 61 (3) : pp 407-412.

Eck A. (1990). Le fromage. 2eme édition. *Technique et Documentation*. Lavoisier, Paris. 539 pages.

El-shouny W.A., (2006). Characterization of bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *El - Minia Sci. bull.*, 17(2): pp 279-304.

Erkkila S., E. Petaja Eerola S., Lilleberg L., Matilla-Sandholm T., Suihto M. LM. L., (2001). Flavor profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter. *Meat Sci.* 58, 111-116. *Cultures. Meat Sci.* 58: pp 111-116.

Expert D., Toussaint A., (1985). Bacteriocin resistant mutants of *Erwinia chrysanthemi*: Possible involvement of iron acquisition in phytopathogenicity. *J.Bacteriol.*, 163(1):pp 221-227.

Exterkate FA., De Veer GJ., (1987). Optimal growth of *Streptococcus cremoris* HP in milk is related to β and α -casein degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 25: pp 471–475.

F

Fadda S., Vignolo G., Holgado A. and Oliver G., (1998). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Science*, 49 : pp 11-18.

FAO/WHO (2002). Working Group Report on Drafting Guide- lines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, UK
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

Farrow, J. A. E. (1980). Lactose hydrolysing enzymes in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* and in some other species of streptococci. *J. Appl. Bacteriol.* 49: pp 493–503.

Fontán M.C.G., Lorenzo J.M., Parada A., Franco I., Carballo J., (2007). Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*, 24: pp 52–58.

Ferain T., Hobbs J.N., Richardson J., Bernard N., Garmyn D., Hols P., Allen N.E. and Delcour J., (1996). Knockout of the two-ldh genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 178: pp 5431–5437

Filip CIESIELCZYK, Andrzej KRYSZTAFKIEWICZ, Teofil JESIONOWSKI, (2007).

Adsorptive properties of synthetic magnesium silicates. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 41: pp 185-193.

Fortin C., Vuilleumard J.C., (1989). Effect of immobilization in calcium alginate beads on regulation of protease production by *Myxococcus xanthus* cells. In: *Physiology of immobilized cells*. Ed de Bont JAM, Visser J, Mattiasson B, Tramper J, Elsevier Science, Amsterdam, Pays-Bas

Foulds J., (1972). Purification and partial characterization of a bacteriocin from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 110(3): pp 1001-1009.

Fukushima K., Sogo K., Miura S., Kimura Y., (2004). Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch, *Macromol.Biosci.* 4 pp 1021–1027.

Fox P. F., Lucey J. A. and Cogan T. M., (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29: pp 237-253.

Fox P. F. and Law J., (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology* 5: pp 239–262.

Fontaine M.N., Rault J. and van Oss C. J., (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron acceptor or Lewis acid-base properties of microbial-cells. *Colloids Surf* 7: pp 47–53.

Fuller R., (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32: pp 439-442.

Fuller R., (1992). Probiotics, The scientific basis. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: p. 398.

G

Garde A., Jonsson G., Schmidt A.S., Ahring B.K., (2002). Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolyzate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*, *Bioresour. Tech nol.* 81: pp 217–223.

Gagnon Mélanie, (2007). Rôle des probiotiques lors d’infections entériques d’origine bactérienne et virales, analyses in vitro et études in vivo chez des modèles murins. Thèse de doctorat en sciences et technologie des aliments pour l’obtention du grade de Philosophiae Doctor Université Laval QUÉBEC.

- Galvez A., Abriouel H., Lopez R.L. and Ben Omar N., (2007).** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120** (1-2): pp 51-70.
- Gaudana et al., (2010).** Probiotic attributes of *Lactobacillus* strains isolated from food and of human origin. *British Journal of Nutrition* **103**: pp 1620–1628.
- Ghaly E., Tango M. S. A., Adams M. A., (2003).** Enhanced Lactic Acid production from cheese whey with nutrient supplement addition”, *The CIGR Journal of Scientific Research and Development, Volume V FEMS Microbiol. Lett.* **9**: pp 29–33.
- Geeta Shukla, Gatha Sharma and Nisha Goyal, (2010).** Probiotic Characterization of *Lactobacilli* and Yeast Strains Isolated from Whey Beverage and Therapeutic Potential of *Lactobacillus* Yoghurt in Murine Giardiasis *Am. J. Biomed. Sci.* **2(3)**: pp 248-261.
- Geertsema-Doornbusch G.I., van der Mei H.C. and Busscher H.J., (1993).** Microbial cell surface hydrophobicity: the involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). *J. Microbiol. Methods* **18** : pp 61–68.
- Gill S.R.M., Pop R.T., Deboy P.B., Eckburg P.J., Turnbaugh B.S., Samuel J.I., Gordon D.A., Relman C.M., Fraser-Liggett and Nelson K.E., (2006).** Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312(5778)**: pp 1355-1359.
- Granato, F., Perotti I., Masserey M., pouvet R.M., Golliard and Servin A., (1999).** Cell surface- associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **65** : pp 1071-1077.
- Grattepanche F., (2005).** Etude d’un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse de doctorat (Ph.D.) en sciences et technologie des aliments faculté des sciences de l’agriculture et de l’alimentation. Université Laval Quebec.
- Groboillot A.F., Champagne C.P., Darling G.D., Poncelet D. and Newfield R.J., (1993).** Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*, *Biotechnology and Bioengineering*, **42**: pp 1157-1163
- Gropper S., Smith J. et al. (2009).** **Advanced Nutrition and Human Metabolism.** Wadsworth, Wadsworth Cengage Learning
- Guglielmotti D. M., Marco M. B., Golowczyc M., Reinheimer J. A. and Quiberoni A. L., (2007).** "Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants", *International Dairy Journal*, **17**, p 916.
- Guessas B., Kihal M., (2004).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goats' milk. *Afr. J. Biotechnol.* **3** : pp 339-342
- Guiraud J.P., (2003).** *Microbiologie alimentaire*, Dunod, Paris. 615 p.

- Goh Y.J. and Klaenhammer T.R., (2010). Functional roles of aggregation promoting like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM®. Applied Environmental Microbiology. 76: pp 5005-5015.**
- Gonçalves L. M. D., Barreto M.T., Xavier A., Klein J., (1992). Inert supports for lactic acid fermentation a technological assessment Applied Microbiology and Biotechnology December 1992, Volume 38, Issue 3: pp 305-311.**
- Gordin BR, Gorbach SL., (1992). Probiotics for humans. In: Probiotics, the scientific basis, Fuller R. (Eds.), London, Chapman and Hall: pp: 355-376.**
- Gourreau J.M., 1995. « Accidents et maladies du trayon »-décembre 1995- Editions France Agricole : pp 105-106 et 205-202.**
- Gwiazdowska D.A., Trojanowska K., (2006). Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *Shermanii*. Dairy Sci. Technol., 86(2): pp 141-154.**
- Gomes A. M., Malcata Y. F. et Claver F. A., (1998). Growth enhancement of bifidobacterium Journal of Dairy Science. 81: pp 1817-2825.**
- Goncalves L.M.D., Barreto M.T.O., Xavier A.M.B.R., Carrondo M.J.T., Klein J., (1992). Inert supports for lactic acid fermentation: a technological assessment. Appl Microbiol Biotechnol 38: 305- 311J. Macromol. Sci. Chem. A 26 : pp 1183–1203.**
- González-Fernández E.M.S., Jaime Rovira, (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. Food Microbiol. 20: pp 275–284.**
- Giaouris E., Chapot-Chartier M.P. and Briandet R., (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. Int. J. Food Microbiol. 131: pp 2-9.**
- Groboillot A., Boadi DK., Poncelet D., Neufeld RJ., (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. Crit. Rev. Biotechnol . 14: pp 75-107.**
- Grappin R., Rank T. C. and Olson N. F., (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. J. Dairy Sci., 68: pp 531-40.**
- Gutiérrez-Méndez N., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova AF., Nevárez-Moorillón GV., Rivera-Chavira B., (2008). Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. J. Dairy Sci. 91(1): pp 49-57.**
- Guglielmotti D.M., Marco M.B., Golowezye M., Reinheimer J.A. et Quiberoni A.D.L., (2007). Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. Int. Dairy J. 17 : pp 916-925.**

- Haertlé T., Topisirovic L., (2008).** Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *Oral Microbiol. Immunol.*, 23(3): pp 254-258.
- Harendranath C.S., Anuja K., Singh A., Gunaseelan A., Satish K. and Lala K., (1996).** Immobilization in fixed film reactors: an ultrastructural approach. *Water Science and Technology*, vol. 33, no. 8: pp. 7-15.
- Hata T., Tanaka R., Ohmomo S., (2010).** Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Int. J. Food Microbiol.*, 137(1): pp 94-99.
- Helness H. and degaard H., (1999).** Biological phosphorus removal in a sequencing batch moving bed biofilm reactor. *Water. Sci. Tech.* 40(4-5) : pp161-168.
- Hernandez D., Cardell E., Zarate V., (2005).** Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J. Appl. Microbiol.*, 99: pp 77-84.
- Hirscha A. and Grinsted E., (1951).** The differentiation of the lactic streptococci and their antibodies. *Journal of Dairy Research* 18: pp 198-204.
- Houlihan A.J., Russell J.B., (2006).** Factors affecting the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5: release, stability and binding to target bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 100(1): pp 168-174.
- Hsich H.Y., Paik H.D., Glatz B.A., (1996).** Improvement of detection and production of propionic PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *J. Food Prot.*, 59: pp 734-738.
- Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal B., (2000).** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microb. Technol.* 26: pp 87–107.
- Hols P, Ramos A, Hugenholtz J, Delcour J, de Vos WM, SantosH & Kleerebezem M (1999)** Acetate utilization in *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase: a rescue pathway for maintaining redox balance. *J. Bacteriol.* 181: 5521–5526
- Hujanen M., Linko Y.Y., Leisola M., (2001).** Optimization of media and cultivation conditions for L (+) lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: pp126–130.
- Hugas M. and Monfort J.M., (1997).** Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 59 (4): pp 547-554.
- Hughes M.C., Kerry J. P., Arendt E.K., Kenneally P.M., McSweeney P.L.H. and O'Neill E., (2002).** Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science* 62 (2): pp 205-216.
- Hugenholtz Jeroen Michel Kleerebezem, Marjo Starrenburg, Jean Delcourt, Willem devos and Pascal Hols, (2000).** *Lactococcus lactis* as a Cell Factory for High-Level

Diacetyl Production Applied and environmental microbiology, 0099-2240/00/: pp 4112–4114.

Hutt P., Shchepetova J. et al., (2006). "Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero and uropathogens." *J Appl Microbiol* 100(6): pp1324-32.

Hydrominus B., Le Marrec C., Hadj Sassi A., Deschamps A., (2000). Acid and bile tolerance of spore- forming lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 61: pp 193–197.

I

Ilmén M., Koivuranta K., Ruohonen L., Suominen P., Penttilä M., (2007). Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipites* Applied and Environmental Microbiology, 73 (1): pp 117–123.

Izquierdo E., Wagner C., Marchioni E., Aoude-Werner D., Ennahar S., (2009). Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from Munster cheese. *Appl Environ Microbiol*, 75(13) :4273-6.

J

Jabrane A., Destain J., Compère P., Ledoux L., Calbergbacq C.M., Thonart P., (1994). A screening technique to isolate bacterial strains producing high molecular weight Bacteriocins. *Biotechnology Techniques*, 8(10) : pp 751-754.

Jacquinet SA., (2009). Evaluation du dépistage des mammites par la conductivité électrique du lait Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, p 134, université Paul-Sabatier, Toulouse.

Jaroniec M., Jaroniec C.P. AND Kruk M., (1999). Adsorption and thermogravimetric Methods for Monitoring Surface and Structural Changes in Ordered Mesoporous Silicas Induced by their Chemical Modification Adsorption, Kluwer Academic Publishers 5: pp 313–317.

Jeanson S., Hilgert N., Coquillard M.O., Seukpanya C., Faiveley M., Neveu P., Abraham CH., Georgescu V., Fourcassie P., Beuvier E., (2009). Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131: pp 75-81.

Jenness R., (1979). Comparative aspects of milk proteins. *J. Dairy Res.* 46: pp 197-210.

Jesionowski T., Krysztafkiewicz A., (2001). Influence of silane coupling agents on surface properties of precipitated silicas, *Applied Surface Science*, 172: pp 18-32.

Joshi V.K., Sharma S., Rana N.S., (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(3): pp 435-439.

- Jouenne T., Tresse O., Junter G., (1994).** Agar entrapped bacteria as an *in vitro* model of biofilms and their susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: pp 237-242.
- Joosten H., Northolt L., (1989).** Detection, growth, and amine-producing capacity of Lactobacilli in cheese. *Appl Environ Microbiol.* pp 2356–2359
- Jyoti B., Suresh A.K., Venkatesh K.V., (2003).** Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: pp 509–515.
- Juillard V., Le Bars D., Kunji ERS., Konings WN., Gripon J-C. and Richard J., (1995).** Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: pp 3024-3030.
- Julien M.-C., Dion P., Lafrenière C., Antoun H. and Drouin P., (2008).** Sources of Clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 74, No. 20: pp. 6348- 6357.

K

- Kaizu H., Sasaki M., Nakajima H. and Suzuki Y., (1993).** Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J. Dairy Sci.* 76: pp 2493-2499.
- Kandarakis I.G., Moschopoulou E.E., Moatsou G.A. and Anifantakis E.M., (1998).** Effect of starters on gross and microbiological composition and organoleptic characteristics of Graviera Kritis cheese. *Lait* 78 : pp 557-568.
- Karam N., (1995).** Constitution d'un soucier de bactéries lactiques à intérêt biotechnologique : étude biochimique et moléculaire. Thèse de Doctorat d'État Université d'Oran.
- Karel S.F., Libicki S.B., Robertson C.R., (1985).** The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem Eng Sci* 40: pp 1321-1354.
- Karthykeyan V., Santosh S.W., (2009).** Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3(5): pp 233-239.
- Khalid F., Siddiqui R., Mojgani N., (1999).** Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (Lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of lactobacilli. *Med. J. Islamic Acad. Sci.*, 12(3): 67-71.
- Khalil R., Elbahloul Y., Djadouni F., Omar S., (2009).** Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pakistan J. Nutr.*, 8(3): 242-250.
- Keweloh H., Heipieper H. J. and Rehm H. J., (1990).** Phenol tolerance of immobilized cells. I n: *Physiology of Immobilized Cells.* pp. 545-550. de Bont, J. A. M., Visser, J., Mattiasson, B. & Tramper, J., Eds., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam
- Kimoto H., Ohmono S., Okamoto T., (2002).** Cholesterol removal from media by lactococci. *J. Dairy Sci.* 85: 3182-3188.

- King N., (1948).** Modification of the Voges– Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethyl carbinol plus diacetyl in butter cultures. *Dairy Ind.* 13: pp 860-866
- Klein G., Klein A., Pack C., Bonaparte G.R., (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria *Int. J. Food Microbiol.*, 41 (2): pp. 103–125.
- Klaenhammer T.R., (2005).** Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: pp 3906-3912.
- Klaenhammer T.R., (1988).** Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Bio- chemie*, 70: pp 337–349
- Klaenhammer, T.R., (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: pp 39–86.
- Klein J. and Vorlop KO., (1985).** Immobilization techniques-cells. In: *Comprehensive Biotechnology*, Murray Moo Young. ed Pergemon, NewY ork: pp 203-224.
- Klijn N., Weerkamp A.H., de Vos W.M.. (1995)** Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: pp 2771- 2774.
- Krisch J., Szajani B., (1997).** Ethanol and acetic tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti* . *Biotechnol Lett* 19: pp 525-528.
- Krisch J., Szajani B., (1997).** Ethanol and acetic tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti* . *Biotechnol Lett* 19: 525-528.
- Krishnan S., Gowda L.R., Misra M.C., Karanth N.G., (2001)** Physiological and morphological changes in immobilized *L. plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnol* 15: pp 193-202.
- Komprda T., Smělá D., Pechová P., Kalhotka L., Štencl J., Klejdus B., (2004).** Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 67: pp 607-616.
- Kumar M., Ghosh N., Srivastava S., (2010).** Production and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* LR/6. *The Int. J. Microbiol.*, 8(1), 12-21.
- Kourkoutas, Y.; Kandyliis, P.; Panas, T.; Dooley, J.; Poonam, S.; Koutinas, A.A.2006** Evaluation of freeze-dried kefir co-culture as starter in Greek Feta-type cheese production. *Appl Environ Microbiol*, 72: pp 6124-6135.
- Kulozik U. and Wilde J., (1999).** Rapid lactic acid production at high cell concentration in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 24, no. 5-6: pp 297-302.

L

- Lafarge V., Ogier JC., Girard V., Maladen V., Leveau JY., Delacroix-Buchet A., (2004).** The potential of TTGE to study bacterial some raw milk and dairy products.169 – 178 - In Milk 84. - Paris: INRA, EDP Sciences.
- Laemmli U.K., (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: pp 680-685.
- Lambolely L., Lacroix C., Artignan JM., Champagne CP., Vuilleumard JC., (1999).** Long-term mechanical and biological stability of an immobilized cell reactor for continuous mixed-strain mesophilic lactic starter production in whey permeate. *Biotechnol. Prog.* 15: pp 646-654.
- Larrouture C., Ardaillon V., Pépin M. and Montel M. C.,(2000).** Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology* 17 (5): pp 563-570.
- Latrille E., Picque D., Perret B. and Corrieu G., (1992).** **Characterizing acidification kinetics by measuring pH and electrical conductivity in batch thermophilic lactic fermentations.** *J. Ferment. Bioeng.* 74: pp 32–38.
- Latorre-Moratalla M.L., Bovercid S., Aymerich T., Marcos B., Vidal-Carou M.C. and Garriga M., (2007).** Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science* 75 (3): pp 460-469.
- Laouabdia Sellami, Badis A., guetarni D., Ouzrout R. and kihal M., (2007).** Phenotypique characterization of lactic bacteria isolated from believed milk of goat of two caprine population local arabia and kabyle. *Journal of animal and veterinary advances* 6(12): pp 1474-1481.
- Law BA., (1979).** Review of the progress of Dairy Science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research*, 46: pp 573-588.
- Law BA., (1984).** Flavor development in cheeses. In: Davies FL., Law BA., editors. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* Barking, Essex, England: Elsevier Applied Science Publishers: pp 187–208.
- Lecoq R., (1965).** Manuel d'analyses alimentaires tome II. Ed Dion Paris: pp 1616-1621.
- Lee Joo-Yeon, Kim Cheon-Jei Kunz and Benno Lee., (2006).** Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Science* 72 (3): pp 437-445.
- Leeuwenhoek A. (2002).** *Discovering lactic acid bacteria by genomics.* Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands; 82; pp 29- 58.
- Leroy F. et al., (2006).** Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *L. amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**: pp 102-111.

- Lerebour G., Cupferman S. and Bellon-Fontaine M. N., (2004).** Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *J Appl Microbiol* 97: 7-16.
- Limsowtin G.K.Y., Powell I.B. and Porente E., (1996).** "Type of starters", Cogan, T.& Accolas, J. (Eds.), *Dairy Starters Cultures*,
- Lim S.M., Dong-Soon I.M., (2009).** Screening and characterization of probiotic Lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnology*. 19(2): pp 178–186.
- Lin MY., and Yen CL., (1999).** Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. *J. Dairy Sci.* 82 : pp 1629–1634.
- Lindgren S.E. and Dobrogosz W.J., (1990).** Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiol. Rev.* 87: pp 149–164.
- Lister J., (1873).** A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. J. Microbiol. Sci.* 13: pp 380-40.
- Litchfield, J.H., (1996).** Microbiological production of lactic acid, *Adv.Appl. Microbiol.*
- Loubiere P., Novak L., Coccagn-Bousquet M., Lindley N.D., (1996).** Besoins nutritionnels des bactéries lactiques : interactions entre flux de carbone et d'azote, *Lait* 76 : pp 5 – 12.
- Lopes F.A., Mrin P., Oliveira R. and Melo L. F., (2005).** The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Colloids Surf Bointerfaces* 46: pp 127-33.
- Longdet I.Y., Kutdhik R.J. and Nwoyeocha I.G., (2011).** The probiotic efficacy of *Lactobacillus casei* from human breast milk against Shigellosis in Albino rats, *Advances in Biotechnology and Chemical Processes* 1: pp 12-16.
- Lowry O.H., Roserbough N.J., Farr A.L., Randall R.J., (1951).** Protein measurement with folin-phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 193: pp 265-275.
- Lorca G.L. and de Valdez G.F., (2009).** *Lactobacillus* Stress Responses .In: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, Å. Ljungh, T. Wadström (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK: pp. 115–138.
- Lucas S. et Reyrolle J., (1989).** Etude d'un lot de ferments lactiques mésophiles. Equilibre des flores au cours de la première étape de la fabrication du levain .*Lait* 69 (2) : pp 121-130.
- Lucke F.K., (2000).** Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56: 105-115. 42: pp 45–95.
- Lya M.H.,_ Aguedoc M., Goudota S., Lea M.L., Cayotd P., Teixeira J.A., Leb T.M., Belina J.-M., Wache Y., (2008).** Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability, *Food Hydrocolloids* 22: pp742–751.

Iyer R., Tomar S.K., Maheswari T.U. and Singh R., (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 20, pp 133-141.

Lyon WJ., Glatz BA., (1991). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. Appl Environ Microbio/57 : pp 701-706.

M

Majid Jamshidian, Elmira Arab Tehrani, Muhammad Imran, Muriel Jacquot and Stephane Desobry, (2010). Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol.9.

Macedo M.G., Lacroix C., Gardner N.J. and Champagne C.P., (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. International Dairy Journal, vol. 12, no. 5: pp 419-426.

Madiedo Ruas P., de los Reyes-Gavilán C.G., (2005). Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science, Vol. 88: pp 843–856.

Mallika Boonmee, Noppol Leksawasdi, Wallace Bridge, Peter L., (2003). Rogers Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development Biochemical Engineering Journal 14: pp 127–135.

Mallet A., Guéguen M., Desmasures N., (2010). Etat des lieux de la diversité microbienne quantitative et qualitative de laits crus normands destinés à la transformation fromagère. 8ème Congrès National de la SFM, 2-4 juin, Marseille. France

Malgorzata Bodaszewska-Lubas, Monika Brzychczy-Wloch, Tomasz Gosiewski, Piotr B. Heczko, (2012). Antibacterial Activity of Selected Standard Strains of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins – Pilot Study Postepy Hig Med Dosw (online), tom 66: pp 787-794.

Mami, A., Henni, J. E., Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. World J. Dairy & Sci, 3: pp 39-49.

Manoj Kumar, Ravinder Nagpal, Rajesh Kumar, Hemalatha Vinod Verma, Ashok Kumar, Chaitali Chakraborty, Birbal Singh, Francesco Marotta, Shalini Jain, and Hariom Yadav, (2012). Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases Review Article Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research Volume 2012, Article ID 902917, 14 pages.

Marteau P., Pochart J., Dore C., Bera Mailler A., Bernalier and Corthier G., (2001). Comparative study of bacterial groups within the human coecal and faecal microbiota. Applied and Environmental Microbiology, 67: pp 4939–4942.

- Marteau P., Cuillerier E., Méance S., Gerhardt M.F., Myara A., Bouvier M., Bouley, C., Tondou F., Bommelaer G. and Grimaud J.C., (2002).** *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double blind, randomized, controlled study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 16: pp 587-593.
- Martin R., Jimenez E., Olivares M., Marin M.L., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez, J.M., (2006).** *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 112: pp. 35-43
- Martirani L., Varcamonti M., Naclero G., De Felice M., (2002).** Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 1(1): pp 1-5.
- Martínez J.M., Kok J., Sanders J.W. and Hernández P.E., (2000).** Heterologous co-production of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide- directed antibodies. *Applied Environmental Microbiology*, 66: pp 3543-3549.
- Mayr-Harting A., Hedges A.J., Berkeley RCW., (1972).** Methods for studying bacteriocins, p.315-422. In Norris JR, Ribbons DW, editors, *Methods in microbiology*, vol.7a .Academic Press, NewYork..
- McKay LL., Baldwin KA., (1990).** Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 87: pp 3-14.
- Menard S., Candalh C., Bambou JC., Terpend K., Cerf-Bensussan N. and Heyman M., (2004)** Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 53 : pp 821–828.
- Menoret C., (2001).** Traitement d'effluents concentrés par cultures fixées sur gravier ou pouzzolane. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, France.
- Messaoudene Ibrahim, Jauberthie Raoul, Molez Laurent, Nacéri Abdelghani., (2010).** Ecological and economical mortars made with dune sand and cements in combination with local mineral additions; *Agric Eng Int: CIGR Journal Open access* at <http://www.cigrjournal.org> Vol. 12, No.3
- Messing RA., Oppennan RA. and Kolot F.B., (1979).** Pore dimensions for accumulating biomass. *ACS Symp. Ser.* 106: pp 13-28.
- Meyer et Pierre Denis christian, (1999).** Élevage de la vache laitière en zone tropicale Ouvrage technique. Le Cirad
- Michel V., Hauwuy A., Montel M.C., Coulon J.B. and Chamba J.F., (2005).** Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus (Breeding practices and microbial composition of raw milks). *Territoires et enjeux du développement regional.* Lyon, 9-11 Mars 2005. INRA.
- Michel V., Hauwuy A., Chamba J.F., (2001).** La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81 : pp 575-592.

- Mills M., Stanton C., Hill C., Ross R.P., (2011).** New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Ann. Rev. Food Sci. and Technol.*, 2: pp 299-329
- Mirdamadi S., Tafreshi SH., Norouzi D., Khatami S., Sardari S., Ghazvini SA., (2008).** Optimization of fermentation parameters effect on nisin production. *J. Biotechnol.* 1365: pp 5290-5344.
- Miura S., Arimura T., Hoshino M., Kojima M., Dwiarti L., Okabe M., (2003).** Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors, *J. Biosci. Bioeng.* 96: pp 65–69.
- Montel MC., Beuvier E., Hauwuy A., (2003).** Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers Séminaire *INRA-INAO* Systèmes d'élevage et typicité des produits laitiers.
- Moreno MRF., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., Vuyst E., (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiology*, 106(1): pp 1–24.
- Morisset D., Berjeaud J.M., Frere J., Hechard Y., (2005).** Bactériocines de bactéries lactiques. In *Bactéries lactiques et probiotique*. Ed. Agroalimentaire CST. Lavoisier, 307: pp 113 - 209.
- Moulay M., Benlahcen K., , Aggad H. and Kihal M., (2013).** Diversity and Technological Properties of predominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian raw goat milk. *Advances in Environmental Biology* 7(6) : pp 999-1007.
- Moghaddam M.Z., Sattari M., Mobarez A.M., Doctozadeh F., (2006).** Inhibitory effect of yogurt *Lactobacilli* bacteriocins on growth and Verotoxins production of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 9(11): pp 2112-2116.
- Moulay M., Benlahcen K., Aggad H. and Kihal M., (2013).** Diversity and Technological properties of Predominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk. *Advances in Environmental Biology*, 7(6): pp 999-1007.
- Mostafa Ghasemi¹, Ghasem Najafpour¹, Mostafa Rahimnejad, Pouyan Aeineh Beigi¹, Mehdi Sedighi and Babak Hashemiyeh., (2009).** Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus* *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (1): pp. 81-84,
- Molina Q.P. and Piot J.M., (1997).** “Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a hemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process,” *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, vol. 20, no. 11: pp 1717–1739.
- Montel C., Masson F., Talon R., (1998).** Bacterial role in flavor development. *Meat science*, vol 49, n° suppl. 1: pp 111-121.
- Muthukumarasamy P. and Holley R.A., (2006).** Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology* 111 (2): pp 164-169.

N

- Naghmouchi K., Belguesmia Y., Baah J., Teather J., Drider, J., (2010).** Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with Polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162: pp 99-107.
- Naima SAAD, (2010).** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche in vitro. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Limoges.
- Nath N., Hyun J., Ma H., Chilkoti A., (2004).** "Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions." *Surf. Sci.* pp 570- 98.
- Navrátil M., Sturdík E., (1999).** Bioactive components in productions using immobilized biosystems. *Biologia Bratislava* 54: pp 635-648.
- Nieto-Lozano J. C., Nissen-Meyer J., Sletten K., Pelaz, C. and Nes I.F., (1992).** Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.*, 138 : pp 1985-90.
- Nieto-Lozano J.C., Regura–Useros J.I., Pelaez–Martinez M.C. and De La Torre A.H., (2002).** Bacteriocinogenic activity from starter culture used in Spanish meat industry. *Meat sci.* 62: pp 237 – 243.
- Nissen-Meyer J., Oppengard C., Rogne P., Haugen H.S., Kristiansen P.E., (2010).** Structure and mode of action of the two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *Probiotics antimicrob. Proteins* vol2, no. 1: pp 52-60.
- Norberg E., (2005).** Electrical conductivity of milk as a phenotypic and genetic indicator of bovine mastitis: a review. *Livestock Production Science*, , 96: pp 129-139.
- Norton S., D'Amore T., (1994).** Physiological effects of yeast immobilization: applications for brewing. *Enzyme Microb Technol* 16: pp 365–375.
- Novel G. (1993).** Micro-organismes industriels : les micro-organismes d'intérêt industriel. Éditions Lavoisier Tec et Doc APRIA, 370-392, 307-323
- Nunez M., Medina M., Gaya P., Dias-Amado C. (1981).** Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. *Le Lait*, 61: pp 62-79.
- Naveena B.J., Altaf M., Bhadrappa K., Reddy G., (2004).** Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran, *Food Technol. Biotechnol.* 42 : pp 147–152.
- Nomura Y., Iwahara M. and Hongo M., (1987).** Lactic acid production by electro-dialysis fermentation using immobilized growing cells. *Biotechnol. Bioeng.* 30: pp788-793.

O

- Oberman H., Piatkiewicz A., Libudzisz Z., (1982).** Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *Nahrung* 26: pp 615-623.

- Oda Y., Saito K., Yamauchi H., Mori M., (2002).** Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Curr. Microbiol.* 45: pp1–4.
- Oh S., Kim S.H., Worobo R.W., (2000).** Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, 83: pp 2747-2752.
- Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Onilude A.A., (2003).** Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol.*, 2(8): pp 219-227.
- Oliveira R., Azeredo J., Teixeira P. and. Fonseca A.P., (2001).** The role of hydrophobicity in bacterial adhesion BioLine
- Orla-Jensen S., (1919).** The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Host and Sons.
- O'Toole George, Heidi Kaplan B. and Roberto Kolter., (2000a).** Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: pp 49–79
- O'Toole G.A., Gibbs K.A., Hager P.W., Phibbs P.V., Jr and Kolter R., (2000b).** The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182: pp 425–431.
- Orla-Jensen, S., A. O. Orla-Jensen, and B. Spur. 1926.** The butter aroma bacteria. *J. Bacteriol.* 12: pp 333. 335.
- Ouwehand AC., Kirjavainen PV., Gronlund M.M., Isolauri E., Salminen SJ., (1999).**
Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *Int Dairy J.* 9: pp 623-630.

P

- Pamuła E., De Cupere V., Dufrêne Y.F., and Rouxhet P.G., (2004).** “Nanoscale organization of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time,” *J. Colloid Interface Sci.* 271: pp 80-91.
- Pan WH., Li P.L. and Liu Z., (2006).** The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarian's faeces. *Anaerobe*, 12:1 pp 48–152.
- Panesar P.S., Kennedy J. F., Gandhi D. N. and Bunko K., (2007).** Bio-utilization of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105: pp 1–14.
- Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P., (2003).** Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their Technol and probiotic properties. *Meat Sci.* 65: pp 859–867.

- Pascual L.M., Daniele M.B., Giordano W., Pajaro M.C., Barberis I.L., (2008).** Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr. Microbiol.*, 56(4): 397-402.
- Pan J. H., Ge X. P., Liu R. X. and Tang H. X., (2006).** Characteristic features of *Bacillus cereus* cell surfaces with biosorption of Pb(II) ions by AFM and FT- IR. *Colloids Surf B* 52: pp 89-95.
- Parsek M. R., Greenberg E.P., (2000).** Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: pp 8789-8793.
- Parmjit S., Panesar John F., Kennedy Charles J., Knill and Maria Kosseva., (2010).** Production of L (+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey Braz. *Arch. Biol. Technol.* v.53 n.1: pp. 219-226.
- Pereira MA., Alves MM., Azeredo J., Mota M. and Oliveira R., (2000).** Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24: pp 181–186.
- Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P. and Bellon-Fontaine MN., (1997).** Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* 63: pp 1725–1731.
- Pereira D.I.A., Gibson G.R., 2002.** Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4689-4693.
- Perdigon G., Maldonado Galdeano C., Valdez J.C. and Medici M., (2002).** Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system, *European Journal of Clinical Nutrition* 56(4): pp 21–26.
- Pennacchia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello F. and Villani F., (2004).** Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *J. Meat Sci.* 67: pp 309-317.
- Pennacchia C., Vaughan E.E., Villani F., (2006).** Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science* 73: pp 90-101.
- Pette J. W., (1949).** Some aspects of the butter aroma problem. 12th Int. Dairy Congr. 2: pp 536- 572.
- Petranxiene et Laped, (1981).** La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. Ed. Tec et Doc. .Lavoisier, Paris.
- Prensil J.E., Kut Ö.M., Dunn I.J., Heinzle E., (1995).** Immobilized biocatalysts. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry.* VCH, Weinheim, Germany.
- Philippeau G., (1986).** Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales. *ITCF.*

Picque D., Perret B., Latrille E., Corrieu G., (1992). Caractérisation et classification de bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. *Lebensm Wiss Technol* 25: pp181-186.

Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C. and Lejune P., (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181(19): pp 5993-6002.

R

Rachid M., Gobbato N., Valdéz, J., Vitalone H. and Perdigón G., (2002). Effect of yogurt on the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing cellular apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 15: pp 209-216.

Ramakrishna SV., Prakasha RS., (1999). Microbial fermentations with immobilized cells. *Curr Sci.* 77: pp 87-100.

Rantsiou K., Urso R., Dolci P., Comi G., Cocolin L., (2008). Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *Int J Food Microbiol* 126 : pp 36–42.

Remeuf F., Cossin V., Dervin C., Lenoir J. et Tomassone R., (1991), “Relations entre les caractéristiques physico- chimiques des laits et leur aptitude fromagère”, *Lait.*, 71 : pp 397-421.

Ritus N., Sole M., Francis A., Loren JG., (1994). Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol Lett*, 120: pp 291-296.

Riley M.A. and Chavan M.A., (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution.* Springer Berlin Heidelberg. New York.

Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: pp 29–33.

Roos S. et Jonsson H., 2002. A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology.* 148 : 433-442.

Rojas M., Ascencio F. and Conway, P.L., (2002). Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microbiol* 68: pp 2330–2336.

Ross S. and Jonsson H., (2002). A high-molecular mass cell- surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiol* 148: pp 433–442.

Roukas T. and Kotzekidou, (1990). Production of lactic acid from depro- teinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. *Enz Microbiol Technol.* 13: pp 33-38.

Ruiz-Moyano S., Martín A., Benito M.J., Nevado F.P., de Guía Córdoba M., (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80: 715–721.

Ruas-Madiedo P., Tuinier R., Kanning M. and Zoon P., (2002). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* on the viscosity of fermented milks. *Int. Dairy J.* 12: pp 689–695.

S

Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D. E., Prevost H. et Kihal M., (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie, *Journal. Algérien des Régions Arides.* N°01: pp. 1-10.

Sakili D., Issoual D., (2003). Les bactéries lactiques dans l'élaboration du SMEN Marocain, *Copyright Académie d'Agriculture de France. Notes de recherche :* pp 1-3.

Sanchez L.A., Hedstrom M., Delgado M.A., Delgado O.D., (2011). Production, purification and characterization of serracin A, a novel cold active antimicrobial produced by *Serratia proteamaculans* 136. *J. Appl. microbiol.*, 109(3): pp 936-45.

Sandine W.E., Elliker P.R. and Hays H., (1962). Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic Streptococcus group. *Can J. Microbiol.*, 8; 161-174.

Sandine, W.E. (1985). The streptococci milk. In *Bacterial Starter Cultures for Foods* ed. Gilliland, S.E.: pp. 5-23. Boca Raton: CRC Press, Inc.

Santos E.M., Jaime I., Rovira J., Lyhs U., Korkeala H. and Bjorkroth J., (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in ‘‘morquilla de Burgos’’. *Int J Food Microbiol* 97: 285–296.

Sarika A.R., Lipton A.P., Aishwarya M.S., (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Adv. J. food Sci. Technol.*, 2(5): 291-297.

Sarote Sirisansaneeyakul, Phenjun Mekvichitsaeng, Kesorn Kittikusolthum, Mechai Laddee, Sittiwat Lertsiri, Supapong Bhuwathanapun and Ayaaki Ishizaki, (2000). Continuous Fermentation of Lactic acid Production by *Lactococcus lactis* IO-1.12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology Nov/Sci. Technol. 24: pp 15–30.

Seatovic S.L., Novakovic J.S.J., Zaravisc G.N., Radulovic Ž.Č., Gavrovic-Jankulovic M., Jankov R.M., (2011). The partial characterization of the antibacterial peptide bacteriocin G2 produced by the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* G2. *J. Serb. Chem. Soc.*, 76(5): pp 699– 707.

Sharpe M. E., (1979). Lactic acid bacteria in the dairy industry. *J. Soc. Dairy Technol.* 32: pp 9-18.

Strevett K. A. and Chen G., (2003). Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology* 154: pp 329-335.

- Smarda J., Benada O., (2005).** Phage tail-like (High-molecular-weight) bacteriocins of *Budvicia aquatica* and *Pragia fontium* (Enterobacteriaceae). Appl. Environ. Microbiol., 71(12): pp 8970-8973.
- Stadhouders J. (1974).** Dairy starter cultures. Milchwissenschaft 29: pp 329-337.
- Stadhouders J., (1986).** The control of cheese starter activity. Netherlands Milk Dairy Journal 40: pp 155-173.
- Starovoitova S., Kishko K., Lazarenko L., Shynkarenko L., Spivak M., Nikolaychuk M., (2010).** Cholesteraze activity of new lacto- and bifidobacteria strains in vitro //Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. –. –Вип. 27. – С. 1–4.
- Salama S.M., Musafija-Jeknic T., Sandine W.E., Giovannoni S.J., (1995).** An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *J Dairy Sci* 78 : pp 1004-1017.
- Scannell A.G.M., Schwarz G., Hill C., Ross R.P. and Arendt E.K., (2001).** Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. International Journal of Food Microbiology 64: pp 151–159.
- Scannell A. G. M., Kenneally P. M. et Arendt E. K., (2004).** Contribution of starter cultures to the proteolytic process of a fermented non-dried whole muscle ham product. International Journal of Food Microbiology, Vol.93 : pp. 219–230.
- Sébastien André Jacquinet, (2009).** Evaluation du dépistage des mammites par la conductivité électrique du lait. Thèse de docteur vétérinaire, école nationale Toulouse.
- Suripto Dwi Yuwono and Sutopo Hadi, (2008).** Production of Lactic Acid from Onggok and Tofu Liquid Waste with Concentrate *Maguro* Waste Supplement by *Streptococcus bovis* Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2(4): pp 939-942.
- Stiles M.E., (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek., 70: pp 235-249.
- SAAD Naima, (2010).** Caractérisation d'entités moléculaires de surface impliquées dans la relation de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* 299v avec l'hôte : approche in vitro .Thèse université Limoges. Ecole doctorale Biologie – Santé Faculté des Sciences et Techniques Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.
- Salama M.S., Salama T., Musafija-Jeknic W.E., Sandine S., Giovannoni J., (1995).** An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of *Lactococcus* including *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* J. Dairy Sci., 78: pp 1004–1017.

- Savage DC., (1992).** Growth phase cellular hydrophobicity and adhesion *in vitro* of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl Environ Microbiol.* 58(6): pp 1992-1995.
- Schachtsiek M., Hammes W.P. and Hertel C., (2004).** Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied Environmental Microbiology.* 70: pp 7078–85.
- Schepers A., Thibault J. and Lacroix C., (2006).** Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. *Enzyme and Microbial Technology,* 38: pp 324–337.
- Senthuran A., Senthuran V., Mattiasson B., Kaul R., (1997).** Lactic acid fermentation in a reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnol. Bioeng.* 55: pp 841-853.
- Stiles ME., (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria *Antonie van Leeuwenhoek*, Volume 70, Issue 2-4: pp 331-345.
- Simonová M., Stropfová V., Marciňáková M., Haviarová M., Faix Š., Vasilková Z., Lauková A., Šalamon I., (2006).** In: *Proc. Symposium on Chamomile Research, Development and Production*, Prešov, Slovakia, p. 122.
- Strevett K.A., Chen G., (2003).** Microbial surface thermodynamics and applications. *Res. Microbiol.,* 154: pp 329-335.
- Susanne Golby, Howard Ceri, Lisa M. Gieg, Indranil Chatterjee, Lyriam L.R. Marques and Raymond J. Turner, (2011).** Evaluation of microbial biofilm communities from an Alberta oil sands tailings pond. *FEMS Microbiology Ecology* Volume 79, Issue 1.
- Suzzi G., Gardini F., (2003).** Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88: pp 41-54.
- T**
- Tabasco R, García-Cayuel, T, Peláez C, Requena T (2009)** *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 132 :pp 100-116.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker, (1976).** Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Bacteriol. Rev.,* 40: pp 722-756.
- Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T. and Mireau I., (1999).** Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Sciences,* 82: pp 2530-2335.
- Teuber M., (1993).** *Lactic acid bacteria in Biotechnology* vol.1 H-J Reheim and Greed Eds) pp 325-366 VCH press, Weinheim, Germany.
- Teixera de Mattos MJ., de Boer JP., Zoutberg GR., Neijssel OM., (1994).** Metabolic shift analysis at high cell densities. *FEMS Microbiol Rev.* 14: pp 21-28.

- Thompson J.K., Collins M.A. and Mercer W.D., (1996).** Characterization of a proteinaceous antimicrobial compound produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450, J.Appl. Bacteriol., Vol.80: pp.338-348.
- Thomas T.D., Ellwood D.C. and Longyear V.M.C., (1979).** Changes from Homo to Heterofermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose fermentation in anaerobic chemostat culture. Journal of Bacteriology 138: pp 109-117.
- Toba T., Samant SK., Yoshioka E., Itoh T., (1991).** Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. Lett Appl Microbiol 13: pp 281–286.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T., (2004).** Partial characterization of bacteriocins produced by four lactic acid bacteria isolated from regional South African barley beer. Annals Microbiol., 54(4): pp 403-413.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T., (2005).** Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. Food Technol. Biotechnol., 43(2): pp 165-173.
- Todorov S.D., Nyati H., Meincken M., Dicks L.M.T., (2007).** Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. Food Control,18(6):pp 656-664.
- Todorov S.D., Rachman C., Fourier A., Dicks L.M.T., Vanreenean C.A., Prevost H., Dousset X., (2010).** Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobes*, 17(1): pp 23-31.
- Todorov S.D., (2008).** Bacteriocin production by *lactobacillus plantarum* AMA–K isolated from AMASI, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 39: pp 178- 187.
- Tomás M. S. J. and Nader-Macías M. E., (2007).** Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. 2 : pp 732-739.
- Tormo H., Ali Haimoud Lekhah D., Laither C., (2006).** Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. Renc. Rech. Ruminants, 13: pp 305-308.
- Tornadijo M., Fresno J., Bernardo A., Martín R., Carballo J., (1995).** Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). Lait 75: pp 551–570.
- Topisirovic L., KOJIC M., Fira D., Golic N., Straihinic I. and Lozo J., (2006).** Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol, 112: pp 230-235.
- Trauth E., Lemaitre JP., Rojas C., Diviès C., Cachon R., (2001).** Resistance of immobilized lactic acid bacteria to the inhibitory effect of quaternary ammonium sanitizers. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 34: pp 239-243.

Truusalu K., Naaber P., Kullisaar T., Tamm H., Mikelsaar R.H., Zilmer K., Rehema A., Zilmer M. et al. (2004). The influence of antibacterial and antioxidative probiotic lactobacilli on gut mucosa in a mouse model of *Salmonella* infection. *Microb Ecol Health D* 16: pp 180–187.

Työppönen S., Petäjä E., Mattila-Sandholm T., (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83: pp 233-244.

V

Vacheyroux M., Normand A.C., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R. and Bouton Y., (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.*; 146: pp 253–262.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K. and Swings J., (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.*60: pp 407-438.

Vanderbergh P.A., (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth, *FEMS Microbiol. Rev.* 12: pp 221–238.

Van Oss C. J. and Good R. J., (1989). Surface tension and the solubility of phase-separation of polymers in organic media-apolar and polar systems *Sep. Polymers and biopolymers. The role of polar and apolar interfacial free energies.* 763-. *J. Biomed. Mater. properties Res.* 28: pp731–734.

Van Oss C.J., Chaudhury M. K. and Good R.J., (1989). The mechanism of Adhesion of lactobacilli to urinary catheters and diapers: effect of surface to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity.

Venugopal H., Patrick J., Edwards B., Schwalbe M., Claridge J.K., Libich D.S., Stepper ER J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Pascal S.M., (2011). Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated Bacteriocin. *Biochem*, 50(14): pp 2748- 2755.

Verdenelli M.C., Ghelfi F., Silvi S., Orpianesi C., Cecchini C. and Cresci A., (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces, *European Journal of Nutrition* 48: pp 355–363.

Venugopal H.v., Patrick J., Edwards B., Schwalbe M., Clarridge J.K., Llibich D.S., Stepper J., Loo T., Patchett M.L., Norris G.E., Pascal S.M., (2011). Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S- glycosylated bacteriocin. *Biochem.* vol. 50, no. 14: pp 2748-2755.

Verdier-Metz G. Gagne, Monsallier F., Bornes S., Veisseire P., (2011). La surface de trayon des vaches laitières : un réservoir de biodiversité . Montel

Villani F., Aaponte M., Iaiotta G., Mauriello G., Pepe O., Moschetti G., (2002). Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J. Appl. Microbiol.*, 90(3): pp 430–439.

Vinderola C. G., Medici M., and Perdigon G.. (2004). Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulation capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 96: pp 230–243.

Villegas E. and Gilliland SE., (1998). Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* at 5°C, *J. Food Sci.* 6: pp 1070-1074.

Voltan S., Castagliuolo I., Elli M., Longo S., Brun P., D’Inca, R., Porzionato A., Macchi V., Palu G., Sturniolo G.C., Morelli L. and Martines D., (2007). Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization, TLR2, and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clinical Vaccine Immunology.* 14: pp 1138–1148.

W

Wadström T., Andersson K., Sydow M., Axelsson L., Lindgren S. and Gullmar B., (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Microbiol.* 62: pp 513–520.

Wagih El-Shouny, Amal Abo-Kamar, Suzan Ragy1, (2013). Characterization of the partially purified plantaricin SR18 produced by *Lactobacillus plantarum* SR18. *JMBFS*, 2 (5): pp 2301-2305.

Wang J L., Hou W H., Qian Y., (1995). Immobilization of microbial cells using polyvinyl alcohol (PVA)-polyacrylamide gels *J. Biotechnology Techniques*, 10: pp 203–208.

Wareing P., (2005). On farm HACCP for milk production. *Int. Food Hyg.* 16: pp 9–15.

Wee Y.J., Yun J.S., Park D.H., Ryu H.W., (2004). Isolation and characterization of a novel lactic acid bacterium for the production of lactic acid, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9 : pp 303–308.

Wee Y.J., Kim J.N., Yun J.S., Ryu H.W., (2005). Optimum conditions for the biological production of lactic acid by a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. RKY2, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: pp 23–28.

Wegmann U., O’Connell-Motherwy M., ZomerA., Buist G., Shearman C., Canchaya C., Ventura M., Goesmann A., Gasson ,MJ., Kuipers OP., Van Suijderen D., Kok J., (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* MG 1363. *Journal of Bacteriology*189: pp 3256- 3270.

Welman A.D. and Maddox I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21: pp 269-274.

Wen Z.T., Burne R.A., (2002). Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 68: pp 1196-1203.

Y

- Yang R., Johnson M.C. and Ray B., (1992).** Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: pp 3355-3359.
- Yang R. and Ray B., (1994).** Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 11: pp 281-291.
- Yin P., Nishina N., Kosakai Y., Yahiro K., Park Y., Okabe M., (1997).** Enhanced production of L (+)-lactic acid from cornstarch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 84: pp 249–253.
- Young-Jung Wee¹, Jin-Nam Kim and Hwa-Won Ryu¹, (2006).** Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications Technologies- A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: pp 1119-1129.
- Young-Jung Wee, Hyang-Ok Kim, Jong-Sun Yun and Hwa-Won Ryu¹, (2006).** Pilot-Scale Lactic Acid Production *via* Batch Culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 Using Corn Steep Liquor As a Nitrogen Source *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) : pp 293–298.
- Yoo I., Seong GH., Chang HN., Park JK., (1996).** Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enz Microbial Technol.* 19: pp 26-433.
- Z**
- Zalacain I., Zapelena M.J., Astiasaran I. and Bello J., (1996).** Addition of lipase from *Candida cylindracea* to a traditional formulation of a dry fermented sausage. *Meat Sci.* 42: pp 155-163.
- Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J. and De Vuyst L., (2006).** Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 29 : pp 487–495.
- Zanata P., Basso A., (1992).** A new approach to the characterization of *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* based on acidification rates. *Lait* 72: pp 285-295.
- Zhao Q., Molina Piot JM., (1997).** Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a hemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from an ultrafiltration process. *J. Liquid Chromatog. Related Technol.* 20: pp 1717-1739.
- Zdolec N., Hadziosmanovic M., Kozacinski L., Cvrtila Z., Filipovic I., Skrivanko M., Leskovar K., (2008).** Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Sci* 80(2): pp 480-7.